



Efecto leishmanicida e inmunomodulador *in vitro* de extractos y compuestos de plantas colombianas de las familias Lauraceae y Rutaceae

Jeysson Fabián Sánchez Suárez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Maestría en Bioquímica
Bogotá, D. C.
2011

Efecto leishmanicida e inmunomodulador *in vitro* de extractos y compuestos de plantas colombianas de las familias Lauraceae y Rutaceae

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Magíster en Bioquímica de:
Jeysson Fabián Sánchez Suárez

Directora:
Gabriela Delgado Murcia, DrSc Farmacéuticas

Línea de Investigación
Farmacología
Grupo de Investigación:
Grupo de Investigación en Inmunotoxicología

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Maestría en Bioquímica
Bogotá, D. C.
2011

A mi mamá, a quién hago responsable de terminar con
este sueño.

A mi esposa, a mi padre, a mis hermanos, a mi tía
Myriam y a mi tía Martha, porque merecen estar aquí.

Agradecimientos

En este punto llegan a mi mente un gran número de nombres de amigos y de compañeros, que con su valiosa colaboración contribuyeron al desarrollo de este trabajo, algunos de ellos me permito nombrarlos a continuación, con ánimo de expresar mis profundos deseos de agradecimiento.

- En primera instancia, por mi estricta formación católica y porque mi fe así lo dicta, a Dios.
- A los integrantes del Grupo de Investigación en Inmunotoxicología, de manera especial a su líder (y directora de este trabajo) la profesora Gabriela Delgado, por abrirme las puertas de su laboratorio y el apoyo que, en diferentes niveles y circunstancias, constantemente me ofreció. También de forma personal a Julián Pérez, Erika Torres y Norberto Chávez, quienes con su amistad y colaboración aportaron al éxito de este trabajo.
- A Colciencias y a la DIB, a través de los proyectos financiados al Grupo de Investigación en Inmunotoxicología (Quipú No. 202010013640 y 202010013943, respectivamente), que permitieron contar con todo el soporte económico para el apropiado desarrollo de esta tesis.
- Al Departamento de Farmacia y a los grupos de Farmacogenética del Cáncer y Productos Naturales, por la colaboración que prestaron en momentos claves durante la fase experimental.
- Al Grupo de Investigación en Productos Naturales Vegetales y de manera singular a su director, el profesor Luis Enrique Cuca y sus estudiantes Ericsson y Carlos Coy, y a Oscar Patiño.
- A la Maestría en Bioquímica y al Laboratorio de Equipos Comunes de la Facultad de Medicina, por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de aprender.
- Finalmente, a la Universidad Nacional de Colombia por ofrecer un espacio propicio para mi desarrollo profesional, académico y personal.

Resumen

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades infecciosas de naturaleza zoonótica, causadas por parásitos protozoarios de diferentes especies del género *Leishmania*, transmitidos por insectos flebótomos que sirven como vectores (del género *Lutzomyia* para el Nuevo Mundo y *Phlebotomus* para el Viejo Mundo). En el curso de una infección con *Leishmania spp.*, se pueden presentar tres cuadros clínicos conocidos como Leishmaniasis cutánea, Leishmaniasis mucocutánea y Leishmaniasis visceral. En Colombia, anualmente se diagnostican más de 10.000 casos, de los cuales más del 95% corresponden a leishmaniasis cutánea. Los medicamentos de primera línea para el tratamiento de la leishmaniasis son las sales antimoniales pentavalentes (estibogluconato de sodio y el antimoniato de meglumina). Como segunda opción, se cuenta con el isetionato de pentamidina, la miltefosina y la anfotericina B. No obstante, todas ellas se han asociado con efectos adversos a diferentes niveles. Esto, sumado al incremento en el reporte de fallos terapéuticos (asociados con fenómenos de resistencia) y a la ausencia de una vacuna, han hecho imperativa la búsqueda de nuevos agentes antileishmaniales. Teniendo en cuenta el papel importante que juega el sistema inmune en el control de la enfermedad y en la respuesta a un esquema terapéutico, este trabajo planteó la evaluación de la actividad leishmanicida e inmunomoduladora de extractos y compuestos obtenidos de diferentes especies vegetales de las familias Lauraceae y Rutaceae, recolectadas en Colombia. Como resultados se encontró la primera evidencia experimental de actividad leishmanicida relevante en dos extractos etanólicos de dos plantas (una de cada familia), los cuales fueron activos contra promastigotes y amastigotes internalizados de *L. panamensis*. Aunque no se pudo establecer un claro efecto inmunomodulador, estos resultados permiten proponer a estos dos extractos etanólicos, como material de significativo valor para estudios más detallados, a nivel de la actividad tanto leishmanicida como inmunomoduladora.

Palabras clave: *Leishmania panamensis*, *Leishmania braziliensis*, Lauraceae, Rutaceae, *Ocotea*, *Pleurothyrium*, *Zanthoxylum*, leishmanicida, inmunomodulador.

Abstract

Leishmaniasis refers to a group of zoonotic infectious diseases caused by different protozoan parasites from the genus *Leishmania*. It is transmitted by sand flies from the genus *Lutzomyia* in the New World and the genus *Phlebotomus* in the Old World, both of which serve as insect vectors for the transmission of the disease. During the course of an infection with *Leishmania* spp., three clinical manifestations can occur: cutaneous leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis. In Colombia, over 10,000 cases of leishmania are diagnosed each year; over 95% of these cases correspond to cutaneous leishmaniasis. Pentavalent antimonial salts (sodium stibogluconate and meglumine antimoniate) are currently administered as the first-line treatment for these diseases. Other treatment options include pentamidine isethionate, miltefosine and amphotericin B. However, all of these drugs have been associated with adverse effects at different levels. This situation, added to the increasing number of therapeutic failure being reported (associated with resistance) and the absence of a vaccine, has made it imperative to search for new antileishmanial agents. With this purpose in mind and taking into account the important role of the immune system in controlling the disease and the response to the drug treatment, this study assessed the leishmanicidal and immunomodulatory activity of extracts and compounds obtained from different plant species from the family Lauraceae and Rutaceae, all collected in Colombia. As a result, experimental evidence of relevant leishmanicidal activity was found for the first time in two ethanol extracts from two plants (one from each family), which were active against *L. panamensis* promastigotes and internalized amastigotes. Although a clear immunomodulatory effect was not possible to determine, the results allow proposing these two ethanol extracts as raw material of significant value for more detailed studies regarding their leishmanicidal and immunomodulatory activity.

Keywords: *Leishmania panamensis*, *Leishmania braziliensis*, Lauraceae, Rutaceae, *Ocotea*, *Pleurothyrium*, *Zanthoxylum*, leishmanicidal, immunomodulator

Producción Académica

El desarrollo de este trabajo de tesis, permitió la elaboración de los siguientes artículos:

- 1) Leishmanicidal and cytotoxic activities of extracts and naturally-occurring compounds from two Lauraceae species. Publicado en: *Natural Product Communications* (ISSN 1934-578X) 2011, Vol 6, 2: 231-234. Véase Anexo A.
- 2) Evaluación de la actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y fracciones de *Piper cumanense* y *Piper holtonii*. Aceptado para publicación en: Revista Colombia de Ciencias Químico Farmacéuticas (ISSN: 0034-7418). Véase Anexo B.
- 3) Use of a fluorescent stain for evaluating *in vitro* infection with *Leishmania panamensis*. Aceptado para publicación en: *Experimental Parasitology* (ISSN: 0014-4894). Véase Anexo C.

Adicionalmente, algunos de los resultados de este trabajo, fueron presentados bajo el título “Actividad leishmanicida *in vitro* de extractos y compuestos de plantas colombianas de las familias Lauraceae y Rutaceae”, en la modalidad de presentación oral, en el XXIX Congreso Latinoamericano de Química, celebrado en Cartagena del 27 de septiembre al 1 de octubre de 2010. Véase Anexo D.

Contenido

Lista de Figuras.....	XII
Lista de Tablas.....	XIV
Lista de Símbolos y Abreviaturas	XV
Introducción	1
1 Estado del Arte.....	3
1.1 Biología de Leishmania.....	3
1.2 Leishmaniosis	4
1.2.1 Tipos de Leishmaniosis.....	5
1.3 Respuesta inmune frente a Leishmania.....	6
1.3.1 Interacción Parásito – Hospedero	6
1.3.2 Evasión de la respuesta inmune.....	7
1.4 Tratamiento de Leishmaniosis y resistencia a medicamentos	8
1.5 Actividad leishmanicida de productos naturales de origen vegetal	8
1.6 Sistema inmune: susceptibilidad y resistencia a <i>Leishmania</i>	10
2 Fitoquímica.....	12
2.1 Familia Lauraceae	12
2.2 Familia Rutaceae.....	15
3 Actividad Biológica.....	17
3.1 Metodología.....	17
3.1.1 Cultivos Celulares.....	18
3.1.2 Preparación de extractos y compuestos	19
3.1.3 Ensayos de citotoxicidad	19
3.1.4 Ensayos de actividad Leishmanicida sobre promastigotes	20
3.1.5 Actividad leishmanicida sobre amastigotes internalizados.....	21
3.1.6 Evaluación <i>in vitro</i> de la infección de MDMSP	21
3.1.7 Procesamiento y análisis de datos.....	23
3.2 Resultados y Discusión	24
3.2.1 Actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y compuestos de la familia Lauraceae.....	27
3.2.2 Actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y compuestos de plantas de la familia Rutaceae.....	36

4	Inmunomodulación.....	43
4.1	Metodología.....	44
4.1.1	Cuantificación de mediadores solubles	44
4.1.2	Cuantificación de óxido nítrico	45
4.2	Resultados y Discusión	46
4.2.1	Inmunomodulación sobre macrófagos murinos J774.....	46
4.2.2	Inmunomodulación sobre MDMSp	49
5	Conclusiones y Perspectivas.....	63
6	Referencias.....	64
	Anexos.....	71

Lista de Figuras

Figura 2-1.	Estructura de los compuestos 1-15 aislados de plantas de la familia Lauraceae.....	14
Figura 2-2.	Estructura química de los compuestos 16-17 aislados de plantas de la familia Rutaceae.....	16
Figura 3-1.	Tinción de macrófagos infectados con <i>L. panamensis</i>	22
Figura 3-2.	Efecto citotóxico de sustancias derivadas de <i>O. macrophylla</i> sobre macrófagos murinos J774.....	30
Figura 3-3.	Efectividad frente a promastigotes de <i>L. panamensis</i> de extractos y/o compuestos derivados de <i>O. macrophylla</i>	31
Figura 3-4.	Efectividad frente a promastigotes de <i>L. braziliensis</i> de extractos y/o compuestos derivados de <i>O. macrophylla</i>	32
Figura 3-5.	Efecto citotóxico de sustancias derivadas de <i>P. cinereum</i> contra macrófagos murinos J774.....	33
Figura 3-6.	Actividad leishmanicida de sustancias derivadas de <i>P. cinereum</i> contra promastigotes de <i>L. panamensis</i>	34
Figura 3-7.	Efectividad frente a promastigotes de <i>L. braziliensis</i> de extractos y/o compuestos derivados de <i>P. cinereum</i>	35
Figura 3-8.	Actividad citotóxica y leishmanicida de OmE.....	36
Figura 3-9.	Efecto citotóxico de sustancias derivadas de plantas de la familia Rutaceae contra macrófagos murinos J774.....	38
Figura 3-10.	Actividad leishmanicida de sustancias derivadas de plantas de la familia Rutaceae contra promastigotes de <i>L. panamensis</i>	40
Figura 3-11.	Actividad leishmanicida de sustancias derivadas de plantas de la familia Rutaceae contra promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	41
Figura 3-12.	Actividad citotóxica y leishmanicida de ZmE-1 y 16.....	42
Figura 4-1.	Producción de citoquinas y óxido nítrico por macrófagos J774 expuestos a extractos y compuestos de Lauraceae.....	47
Figura 4-2.	Producción de citoquinas y óxido nítrico por macrófagos J774 expuestos a extractos y compuestos de Rutaceae.....	48
Figura 4-3.	Producción de citoquinas por MDMSF expuestos a extractos y compuestos de Lauraceae.....	50

Figura 4-4.	Producción de citoquinas por MDMSP expuestos a extractos y compuestos de Rutaceae.....	52
Figura 4-5.	Producción de NO de MDMSP tratados con LPS.....	53
Figura 4-6.	Producción de IL-10 por MDMSP expuestos a LPS.....	53
Figura 4-7.	Producción de NO por parte de MDMSP tratados con extractos y compuestos de Lauraceae y Rutaceae.....	54
Figura 4-8.	Producción de citoquinas por MDMSP infectados con <i>L. panamensis</i> expuestos a extractos y compuestos de Lauraceae.....	55
Figura 4-9.	Producción de citoquinas por MDMSP infectados con <i>L. panamensis</i> expuestos a extractos y compuestos de Rutaceae.....	56
Figura 4-10.	Producción de NO por parte de MDMSP infectados tratados con extractos y compuestos de Lauraceae y Rutaceae.....	57

Lista de Tablas

Tabla 2-1.	Extractos y compuestos extraídos de plantas de la familia Lauraceae.....	12
Tabla 2-2.	Extractos y/o compuestos obtenidos de plantas de la familia Rutaceae.....	15
Tabla 3-1.	Resultados de los ensayos de citotoxicidad y efectividad sobre promastigotes de <i>L. panamensis</i> y <i>L. braziliensis</i>	25
Tabla 3-2.	Citotoxicidad de extractos y compuestos de plantas Lauraceae sobre macrófagos J774 y MDMSP.....	27
Tabla 3-3.	Potencial leishmanicida de extractos y compuestos de Lauraceae sobre <i>L. panamensis</i> y <i>L. braziliensis</i>	28
Tabla 3-4.	Extractos de Lauraceae activos contra amastigotes internalizados de <i>L. panamensis</i>	34
Tabla 3-5.	Citotoxicidad de extractos y compuestos de plantas Rutaceae sobre macrófagos J774 y MDMSP.....	37
Tabla 3-6.	Potencial leishmanicida de extractos y compuestos de Rutaceae sobre <i>L. panamensis</i> y <i>L. braziliensis</i>	37
Tabla 3-7.	Actividad leishmanicida de extractos y compuestos de Rutaceae contra amastigotes internalizados de <i>L. panamensis</i>	39
Tabla 4-1.	Cuantificación de citoquinas y NO por macrófagos J774 expuestos a extractos y compuestos de Lauraceae y Rutaceae.....	46
Tabla 4-2.	Cuantificación de citoquinas y óxido nítrico por MDMSP expuestos a extractos y compuestos de Lauraceae y Rutaceae.....	60
Tabla 4-3.	Cuantificación de citoquinas y óxido nítrico por MDMSP infectados expuestos a extractos y compuestos de Lauraceae y Rutaceae.	61

Lista de Símbolos y Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BALB/c	Cepa de ratones susceptibles a infección por <i>Leishmania major</i> .
C3b	Fragmento C3 del complemento activado
C3bi	Producto de la proteólisis de C3b por gp63
C57BL/6	Cepa de ratones resistentes a infección por <i>Leishmania major</i> .
CCL2	Quemoquina ligando 2
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
CL ₅₀	Concentración letal 50
CPA	Células presentadoras de antígenos
CR1	Receptor del complemento 1
CR3	Receptor del complemento 3
CRPMI	RPMI suplementado con SFB al 5%
CRPMI	RPMI suplementado con SFB al 5%
DMSO	dimetilsulfóxido
GFP	Proteína verde fluorescente
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
gp63	Metaloproteasa de la superficie del parásito, también conocida como leishmanolisina
IFN- γ	Interferón gamma
IL-12	Interleuquina 12
IL-4	Interleuquina 4
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
INR	intermediarios de nitrógeno reactivos
IOR	intermediarios de oxígeno reactivos
IS	Índice de selectividad
LC	Leishmaniosis Cutánea
LMC	Leishmaniosis Mucocutánea
LPG	Lipofosfoglicano

LV	Leishmaniosis Visceral
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
MDMSP	Macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica
MSR	<i>minimum significant ratio</i>
$M\Phi$	Macrófagos
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NIH	National Institutes of Health
NO	Óxido nítrico
OmE	Extracto etanólico de <i>Ocotea macrophylla</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PcE	Extracto etanólico de <i>Pleurothyrium cinereum</i>
PMN	Polimorfonucleares neutrófilos
Sb	Estibogluconato de sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
SIVIGILA	Sistema de Vigilancia en Salud Pública
SOCS-1	<i>supressor of cytokine signaling-1</i>
SOSC-1	Supresor de señales de citoquinas 1
SYBR	Agente intercalante utilizado para la tinción de ADN
Th1	Linfocitos T “helper” 1
Th2	Linfocitos T “helper” 2
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UAF	unidades arbitrarias de fluorescencia
ZmE	Extracto etanólico <i>Zanthoxylum monophyllum</i>
ZqE	Extracto etanólico de <i>Zanthoxylum quinduense</i>
ZrE	Extracto etanólico de <i>Zanthoxylum rohifolium</i>

Introducción

Las leishmaniosis son un grupo de enfermedades parasitarias, endémicas en 88 países, de los cuales 72 están en vía de desarrollo [1], afecta a más de 12 millones de personas en el mundo, se considera que 350 millones de personas están en riesgo de contraerla y cada año en el mundo se reportan cerca de 2 millones nuevos casos de infecciones [2]. En Colombia, se manifiesta de manera endémica y durante el 2010 el SISTEMA DE VIGILANCIA EN SALUD PÚBLICA (SIVIGILA) reportó para la semana 52, 13.983 casos de leishmaniosis, de los cuales 98,72% correspondían a casos de leishmaniosis cutánea. El 75% de los casos de leishmaniosis cutánea y mucosa se reporta en Antioquia, Caquetá, Guaviare, Meta, Nariño, Santander, y Tolima. Por su parte, los casos de leishmaniosis visceral se concentran en Bolívar, Córdoba, Sucre, y Tolima [3]. Un estudio publicado en 2002 mostró que para Colombia, *Leishmania (L.) panamensis* y *L. braziliensis* son los agentes etiológicos asociados con leishmaniosis más ampliamente distribuidos, no obstante, *L. panamensis* predomina y fue aislada del 82,4% de los pacientes que participaron en dicho estudio [4].

Aunque existen medicamentos que son empleados en el tratamiento contra la leishmaniosis, actualmente existe un incremento en el número de reportes donde se ha identificado una reducción en los niveles de eficacia de las sales antimoniales pentavalentes (fármacos usualmente empleados para el tratamiento de la enfermedad), asociada principalmente a fenómenos de resistencia [5]. Paralelo a lo anterior, la carencia de alternativas terapéuticas han ocasionado la necesidad de incrementar las dosis y el tiempo en los esquemas de tratamiento para los pacientes, aumentando de este modo la incidencia de los efectos adversos conocidos para estas formulaciones, incluyendo la muerte [6].

Sin embargo, algunos de los medicamentos comúnmente usados para tratar otras patologías, han mostrado resultados favorables para el control de la leishmaniosis, no obstante, algunas consideraciones han limitado su aplicación, algunos ejemplos son: la Anfotericina B (la cual ha mostrado una efectividad mayor al 95%), su principal limitante es su elevado costo [7] sin olvidar la toxicidad y el prolongado periodo de tiempo que requiere el protocolo terapéutico [8]. Por otro lado, la miltefosina (hexadecilfosfolina); se ha venido mostrando como un medicamento promisorio, mostrando más de un 91% de eficacia [9], no obstante, el tratamiento requiere un considerable periodo de tiempo que sumada a la farmacocinética de la molécula, predice el desarrollo de resistencia y potencial riesgo teratogénico, sin mencionar además su elevado costo [10]. Todo esto, sumado a la carencia de una vacuna, hace imperativa la búsqueda de nuevas sustancias que apliquen como alternativa terapéutica. A este nivel y conociendo la génesis de la enfermedad y su control natural, es relevante que candidatos a nuevos fármacos antileishmaniales, posean doble propiedad: leishmanicida e inmunomoduladora. Esta última, considerando el papel tan importante que tienen los factores reguladores del sistema inmunológico del hospedero en la resistencia o susceptibilidad natural a la infección [11, 12].

La literatura ha reportado, a través del estudio de extractos o compuestos derivados de plantas usadas en medicina popular, que el reino vegetal es una fuente invaluable para el descubrimiento de nuevos agentes medicinales, con funciones antimicrobianas, incluyendo leishmanicidas [13, 14]. Lo anterior sugiere una gran posibilidad de hallar más compuestos

leishmanicidas y/o inmunomoduladores en plantas colombianas de familias con previa actividad farmacológica reportada.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este proyecto se planteó como objetivo general “Determinar el efecto leishmanicida e inmunomodulador *in vitro* de los extractos y compuestos de plantas de la familia Lauraceae y Rutaceae empleando macrófagos murinos infectados experimentalmente con *L. panamensis*.” Para alcanzar este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos: (i) Determinar el efecto leishmanicida e inmunomodulador *in vitro* de los extractos y compuestos de plantas de la familia Lauraceae y Rutaceae empleando macrófagos murinos infectados experimentalmente con *L. panamensis*, (ii) Establecer la capacidad inmunomoduladora, a través de la cuantificación de mediadores solubles (citoquinas y quemoquinas), tales como IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , y MCP-1 secretados por macrófagos J774, infectados y no infectados, antes y después de la exposición a los extractos y compuestos de plantas de las familias Lauraceae y Rutaceae y, (iii) Estimar la activación de la maquinaria microbicida de macrófagos (cuantificación de los niveles de óxido nítrico) infectados y no infectados, tratados con extractos y compuesto de plantas de las familias Lauraceae y Rutaceae. Es de resaltar, que se logró culminar con el 100% de las actividades propuestas para alcanzar tales objetivos. Más en detalle, 25 productos de origen natural, distribuidos en 2 extractos etanólicos y 15 compuestos de dos plantas pertenecientes a la familia Lauraceae y, 6 extractos y 2 compuestos de tres plantas pertenecientes a la familia Rutaceae, fueron estudiados a nivel de la actividad leishmanicida (sobre promastigotes de *L. panamensis* y *L. braziliensis* y sobre amastigotes internalizados de *L. panamensis*) y, citotóxica (sobre células J774 y cultivos primarios de macrófagos humanos). Adicionalmente se evaluó, el potencial inmunomodulador de los extractos y/o compuestos que resultaron promisorios, sobre J774 y macrófagos humanos, a través de la cuantificación de mediadores solubles tales como citoquinas y producción de óxido nítrico (NO). Como resultado se encontraron dos extractos etanólicos, uno de *Ocotea macrophylla* y otro de *Zanthoxylum monophyllum*, con actividad leishmanicida relevante, equiparable a la mostrada por el estibogluconato de sodio, medicamento de referencia para el tratamiento de Leishmaniosis.

1 Estado del Arte

1.1 Biología de Leishmania

Se denomina *Leishmania* a un género de protozoarios clasificados en la familia Trypanosomatidae del orden Kinetoplastida. Su ciclo de vida comprende dos estadios, uno extracelular, denominado *promastigote* que se ubica en el tracto digestivo del flebótomo; el otro intracelular, denominado *amastigote*, ubicado dentro del fagolisosoma de células del sistema fagocítico mononuclear [1].

Dependiendo de la zona del tracto digestivo del flebotomíneo donde se desarrolle el parásito, las especies de *Leishmania* se agrupan en dos subgéneros. Al subgénero *Viannia* pertenecen la mayoría de las especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo que son restringidas a la sección peripilórica del insecto, mientras que las especies del Viejo Mundo pertenecen al subgénero *Leishmania* se desarrollan en la región suprapilórica [15].

El ciclo de vida en el flebótomo inicia cuando el insecto hembra ingiere sangre que contiene macrófagos infectados con amastigotes, los cuales inician su proceso de diferenciación hacia su forma promastigote, célula flagelada y móvil [15]. Como promastigote, *Leishmania* pasa por dos principales estadios, desarrollándose de una forma no infectiva a una infectiva, proceso conocido como *metaciclogénesis* [16]. La primera forma se conoce como *procíclica*, es de baja movilidad (flagelo corto) pero con una alta capacidad replicativa [15]; transcurridos 6 a 9 días (dependiendo de la especie), pasa a ser una célula sin capacidad proliferativa, con un flagelo elongado y altamente móvil, denominada *metacíclica*, la cual se ha observado acumulada en la válvula estomoidea del vector [15]. Los promastigotes metacíclicos son la forma más infectiva, son resistentes a la lisis mediada por el complemento [16], mecanismo asociado con la abundante presencia en la superficie celular de lipofosfoglicano (LPG) [1, 17].

Finalizada la metaciclogénesis, los promastigotes de *Leishmania* quedan apropiadamente adaptados para ser transmitidos a su hospedero mamífero y sobrevivir a la primera línea de defensa antes de ingresar a la célula hospedera final. Adicional a esto, se ha descrito que los parásitos secretan una sustancia gelatinosa, denominada *gel secretado por promastigotes* (PSG, por “*promastigotes secretory gel*”), la cual bloquea el flujo de sangre y obliga al flebótomo a regurgitar los parásitos antes de poder alimentarse [15], este junto con otros mecanismos, como el daño a la válvula estomoidea en el insecto [15], pueden garantizar su transmisión al hospedero mamífero. Una vez en el hospedero, los promastigotes tienen que resistir en el ambiente extracelular hasta ser captados por los macrófagos. Después de ser internalizados por la célula hospedera, el LPG de la superficie de los promastigotes restringe y retrasa la conformación del fagolisosoma, la cual se ha visto que toma el doble de tiempo para promastigotes infectivos, comparados con una fagocitosis normal [1]. Esta pausa en la biogénesis fagolisosomal, permite al promastigote prepararse y dar inicio al proceso de diferenciación, hacia una forma más resistente a las condiciones microambientales propias del fagolisosoma, el amastigote [16].

Los resultados de diferentes estudios han sugerido que el proceso de diferenciación se puede dividir en cuatro fases [1]: La primera transcurre entre el momento de la internalización y hasta 4 horas después de ésta, y se caracteriza por la recepción y procesamiento de las señales propias que estarían involucradas en la diferenciación, entre las cuales las condiciones físico-químicas de temperatura y pH parecen ser determinantes [18], dejando en claro que el fenómeno aún no es completamente entendido. La siguiente fase se caracteriza por el cese del movimiento e inicia un proceso de agregación entre parásitos (entre 5 y 9 horas), esta fase se da manera sincrónica junto con la anterior [18]. La tercera fase se da entre las 10 y 24 horas y consiste en la adopción de la morfología propia de un amastigote (célula redondeada y de flagelo retraído). Finalmente, el parásito toma de 25 a 120 horas para completar la maduración del amastigote, promoviendo cambios en la expresión de genes que preparan al parásito para su supervivencia en la célula hospedera [1, 16].

1.2 Leishmaniosis

Desde 1988 el termino leishmaniosis, en lugar de leishmaniasis, es el nombre acogido por la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria y la Federación Mundial de Parasitología, según el “*Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases*” (SNOAPAD) [19], para referirse a la patología causada por parásitos del género *Leishmania*, no obstante en la actualidad el término de leishmaniasis sigue siendo usado, incluso con más frecuencia que leishmaniosis [20].

Con más detalle, la leishmaniosis corresponde a un grupo de enfermedades con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad en la mayoría de los países en vía de desarrollo [21]. La enfermedad es causada por diferentes especies del género *Leishmania* (orden Kinetoplastidae), 15 de ellas bien reconocidas por causar la patología en humanos, de las cuales 13 son de naturaleza zoonótica [1]. *Leishmania spp.* es transmitida por aproximadamente 30 especies diferentes de flebotomos, del género *Lutzomyia* en el nuevo mundo y del género *Phlebotomus* en el viejo mundo [1].

Dependiendo de la especie de parásito involucrada y los síntomas que manifieste el individuo después de la infección (asociados con el estado de inmunocompetencia del mamífero), la leishmaniosis puede inducir tres síndromes clínicos: leishmaniosis cutánea (LC), leishmaniosis mucocutánea (LMC) y leishmaniosis visceral (LV), ésta última, la forma fatal de la enfermedad [1].

La enfermedad se manifiesta como endémica en más de 88 países, de los cuales solo 32 la consideran como tal, resultando en la subestimación de la realidad como relevante problemática de salud pública [1]. Globalmente se considera, que 350 millones de personas se encuentran en riesgo y 12 millones están infectadas [21], por lo cual se ha descrito como una enfermedad prioritaria para investigación.

En Colombia durante los últimos años, se diagnosticaron más de 10.000 casos nuevos de leishmaniosis por año [22, 23], los cuales no incluyen el número incierto de casos no reportados, dado también el amplio subregistro de la enfermedad. En 1994 se reportaron casos de leishmaniosis para 1.079 municipios, y se ha predicho una variación en la tasa de incidencia, la cual está en el rango de 2 a 6,66 por cada 100.000 individuos de la población rural [24].

1.2.1 Tipos de Leishmaniosis

Como se había descrito, la enfermedad se puede manifestar como LC, LMC y LV. La evolución de una infección por *Leishmania spp.*, hacia alguna de las tres formas clínicas de la enfermedad, depende de la combinación de variables como: el estatus inmunológico del individuo infectado, de la especie de *Leishmania* involucrada y del zimodema de ésta última [1], principalmente.

- Leishmaniosis Cutánea (LC)

Es la forma con mayor prevalencia en el mundo. En Colombia, un estudio epidemiológico demostró que, *L. panamensis* y *L. braziliensis* son los agentes etiológicos asociados con LC más ampliamente distribuidos, no obstante, *L. panamensis* predominó y fue aislada del 82,4% de los pacientes que participaron en el estudio [4].

En el viejo mundo, la LC es causada por *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica*. En algunos casos también se ha encontrado asociada con casos clínicos de LC, a *L. donovani* y *L. infantum*. En el nuevo mundo las especies involucradas son principalmente *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana*, también están *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. venezuelensis*, estas últimas hacen parte del complejo de especies *L. mexicana* [25]

Usualmente la LC, suele iniciar como una pápula en el sitio de la picadura, la cual entre 1 semana y 3 meses [25] puede incrementar su tamaño, formar un nódulo y terminar como una úlcera franca.

- Leishmaniosis Mucocutánea (LMC)

En el Nuevo Mundo es causada principalmente por *L. braziliensis*, (en algunos casos puntuales se ha asociado con otras especies), en el Viejo Mundo se asocia con *L. donovani*, principalmente y con menos frecuencia *L. major* [25]. El parásito se propaga desde la piel vía linfática y sanguínea semanas después de la primo-infección, localizándose en la mucosa nasal, bucal y faríngea; la aparición de lesiones ulcerativas mucocutáneas se reporta en pocas personas con historia de lesiones cutáneas [26]. Las segundas lesiones mucocutáneas, en ocasiones llegan a ser destructivas. En contraste con LMC del Nuevo Mundo, los pacientes del Viejo Mundo con LMC no presentan historia de LC, y en la mayoría de los exámenes clínicos tampoco hay reportes de cicatrices de lesiones cutáneas curadas/cicatrizadas [26].

LMC afecta la nariz, la cavidad oral y la faringe, lo cual ocasiona una severa dificultad para comer; esto incrementa además, los factores de riesgo para infecciones secundarias [8].

- Leishmaniosis Visceral (LV)

Es causada por la diseminación del parásito a través del sistema mononuclear fagocítico [25]. En algunos casos se ha podido observar, que la visceralización del parásito involucra órganos como: pleura, pulmones, mucosa oral, laringe, esófago, estómago, intestino delgado, médula ósea [8] e incluso el cerebro [27].

Se han descrito síntomas que incluyen: fiebre, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, pancitopenia e hipergammaglobulinemia [27], las cuales suelen aparecer a los 3 meses después de la infección [28]. Caquexia edematosa e hiperpigmentación (por lo que en principio se denominó como kala-azar, que significa “fiebre negra”) son manifestaciones tardías de la enfermedad [28].

La especie de *Leishmania* que se han asociado como agentes etiológicos de LV, son las especies del complejo *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum* en el Viejo Mundo, y *L. chagasi* en el nuevo mundo); también *L. tropica* para el viejo mundo y *L. amazonensis* para el nuevo mundo [25].

1.3 Respuesta inmune frente a Leishmania

Teniendo en cuenta que el parásito es estrictamente intracelular, y que la respuesta inmune es fundamental para la génesis de la enfermedad, encontrar modelos experimentales que permitan elucidar los procesos fisiopatológicos en leishmaniosis, ha sido crítico en la obtención de este conocimiento. En este sentido, estudios en modelos murinos han permitido establecer patrones significativos a nivel de la respuesta inmune. Gracias al empleo de este modelo, se sabe que se requiere una polarización de la respuesta hacia un fenotipo Th1 para lograr resolver la infección (respuesta asociada con protección), mientras, que si el fenotipo que media dicha respuesta es controlado por células Th2, se observa un progreso de la infección (rasgo de susceptibilidad) [29]. En este contexto, las citoquinas presentes durante el “*priming*” de las células T CD4+, son importantes en la polarización de la respuesta inmune. Se ha demostrado que el interferón gamma (IFN- γ), las interleuquinas 12 (IL-12) y 4 (IL-4) juegan un papel crucial en el “*Switch*” de fenotipos resistente (las dos primeras) y susceptible, respectivamente [29]. Sin embargo, en la actualidad los mecanismos moleculares involucrados no han sido totalmente definidos, particularmente para el hospedero humano. Adicionalmente, se han logrado describir, otras poblaciones celulares como los linfocitos T reguladores (Treg), responsables del mantenimiento de parásitos residuales en el sitio de la lesión. La población Treg, se ha postulado como fundamental, para la adquisición de inmunidad contra segundas infecciones [30]. No obstante, también existe evidencia que en un estado crónico de infección, asociado con el mantenimiento de la parasitosis mediado por esta población, se relaciona con infecciones secundarias en lugares distintos al ingreso inicial, lo cual conllevaría a una reactivación de la enfermedad [31]. Lo anterior permite sugerir, que adicional a su papel protector (evitando además el daño colateral a tejidos del hospedador), las Treg, podrían funcionar también, como una estrategia adaptativa para patógenos como *Leishmania spp.* [32].

1.3.1 Interacción Parásito – Hospedero

En los hospederos mamíferos, *Leishmania* es un parásito intracelular obligado de las células del sistema mononuclear fagocítico [17], especialmente de macrófagos [29]. La interacción de *Leishmania*, con la célula hospedera ha demostrado estar mediada por diferentes receptores y muestra un comportamiento clásico de interacción receptor-ligando [33]. Existe evidencia que la internalización del parásito por parte de la célula fagocítica es favorecida por una claro proceso de opsonización [33], que en principio se logra a través de

la acción del sistema del complemento. Sin embargo, algunos estudios han sugerido que las células polimorfonucleares (PMN) neutrófilos también median este proceso y pueden servir como puente entre el parásito y el macrófago [34].

Una vez el parásito, en su forma promastigote, es introducido por la picadura del vector, puede interactuar con moléculas del complemento [33] y/o con células PMNs, principalmente neutrófilos [34]. En cuanto al papel del sistema del complemento en el contexto de una infección por *Leishmania*, se ha mostrado que es importante para la unión y supervivencia del parásito [33]. Es de resaltar que los promastigotes de *Leishmania* deben evadir la lisis mediada por el complemento, lo cual consiguen principalmente a través del lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína gp63 [1]. La presencia de LPG en la superficie del parásito ha mostrado ser crucial para inhibir la unión de las subunidades C5b-C9 del complemento, consiguiendo así escapar de la lisis celular mediada por el complemento [1, 16]. Por su parte gp63, convierte, gracias a su actividad proteasa, la subunidad C3b del complemento en C3bi [1], lo cual evita la posterior formación de la subunidad C5, impidiendo de este modo la lisis mediada por complementó. Además de lo anterior, la C3bi resultante, opsoniza al parásito para su posterior fagocitosis a través de los receptores de complemento (CR) del macrófago, CR1 y principalmente CR3 [1]. Por otro lado, la influencia de los PMNs neutrófilos en leishmaniosis ha sido destacada en publicaciones recientes, donde los han postulado como “caballos de Troya” para la infección de macrófagos [34], pues se ha visto que ante una infección experimental por *Leishmania*, las primeras células fagocíticas en infiltrar al sitio comprometido son PMNs neutrófilos [11]. Además de lo anterior, se ha demostrado que los parásitos sobreviven, aunque no proliferan y mantienen su forma promastigote al interior de los PMNs neutrófilos [34], los cuales a su vez y como consecuencia de la infección con *Leishmania*, retardan su proceso apoptótico hasta 42 horas [35], tiempo en el cual se ha descrito, el pico de migración de macrófagos a la zona de la infección [28] favoreciendo su diseminación.

1.3.2 Evasión de la respuesta inmune

Una vez *Leishmania* ha conseguido ingresar al macrófago (célula destacada e importante para la destrucción de patógenos invasores), debe represar su natural actividad microbicida y la subsecuente promoción de una respuesta inmune específica. Para conseguir esto, es imprescindible que el parásito consiga retardar la conformación del fagolisosoma, proceso en el cual ha mostrado ser crucial la participación del LPG [1], y así disponer de un margen de tiempo que le permita iniciar el proceso de diferenciación hacia su forma amastigote, la cual, a diferencia del promastigote, está adaptada para tolerar el ambiente ácido e hidrolítico del fagolisosoma [1]. Ya en su forma amastigote, a través de las moléculas gp63, peroxidoxinas LcPxn-1, LcPxn-2 y superóxido dismutasa, sobrevive a la actividad de las enzimas hidrolíticas y otras moléculas destructivas propias del fagolisosoma [1].

Por otra parte, *Leishmania* ha mostrado una interesante habilidad para inhibir la presentación antigénica de la célula hospedadora, la cual logra reprimiendo la expresión de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y de moléculas co-estimuladoras como CD80 [1]. Así mismo se ha reportado la inhibición de la expresión de citoquinas importantes en la regulación en una respuesta inmune celular, como Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) e IL-12 [29], esta última esencial en la activación de

linfocitos T productores de IFN- γ , fundamental a su vez, para promover la maquinaria microbicida del macrófago [29]. De esta manera, el parásito garantiza su supervivencia, previniendo la activación de una respuesta inmune efectiva en su contra.

Adicional a estos mecanismos, se ha logrado evidenciar que la infección del macrófago por *Leishmania*, regula diferencialmente su expresión génica, bajo regulando genes claves en las funciones del macrófago [1].

1.4 Tratamiento de Leishmaniosis y resistencia a medicamentos

Los tratamientos de primera línea son las sales antimoniales pentavalentes, las cuales deben ser administradas intramuscular o intravenosamente por un promedio de 4 semanas, a pesar de su reportada toxicidad [6]. El costo del tratamiento varía entre los US\$30 (para el estibogluconato de sodio genérico), US\$120 (antimoniato de meglumina, Glucantime®) o US\$ 150 (estibogluconato de sodio, Pentostam®) [21]. En los casos clínicos donde se reporta fallo terapéutico, los medicamentos de segunda línea para el control de la leishmaniosis resultan altamente tóxicos y sus costos oscilan entre US\$ 60 (Anfotericina B) y US\$ 70 (Pentamidina, Pentacarinat®), y aunque la anfotericina B liposomal no se ha asociado con graves efectos adversos, su elevado costo no favorece el acceso a la gran mayoría de la población afectada (puede superar los US\$ 1500, por tratamiento) [21].

Sumado a los problemas de costos y efectos adversos del tratamiento, la adherencia al mismo se ha visto afectada por problemas como las grandes distancias para acceder a los centros de salud y la dificultad del transporte, lo cual entre otros, ha promovido la aparición de cepas resistentes al tratamiento [5, 10]. Esta adquisición de resistencia, o pérdida de susceptibilidad por parte del parásito, se ha visto reflejada en el incremento de la concentración del medicamento y duración de la terapia [1].

La resistencia a la quimioterapia antileishmanial ha sido reportada en el Sur de Europa, Irán, Noreste de India y desde luego en Suramérica [1, 5].

1.5 Actividad leishmanicida de productos naturales de origen vegetal

Establecida la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas, más accesibles, preferiblemente para administración tópica, parenteral u oral y teniendo en cuenta que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha avalado el uso de la medicina tradicional donde los servicios apropiados de salud son inaccesibles, se ha promocionado la búsqueda de nuevos compuestos con actividad leishmanicida en productos naturales [13].

La utilización de plantas en el tratamiento de leishmaniosis ha sido ampliamente practicada por los habitantes de zonas rurales [36]. En la literatura se reporta una extensa variedad de extractos y moléculas de origen natural, que han mostrado actividad leishmanicida en pacientes procedentes de distintas partes del mundo [13]. En Colombia, está descrito que plantas tales como *Annoa muricata* (familia Annonaceae) [37],

Tabernaemontana obliqua (familia Apocynaceae) [38], *Huberodendron patinoi* (familia Bombacaceae) [38], *Protium amplum* (familia Burseraceae) [38], *Marila laxiflora* (familia Clusiaceae) [38], *Guarea polymera* (familia Meliaceae) [38], *Otoba novogranatensis* y *O. parvifolia* (familia Myristicaceae) [38], *Swinglea glutinosa* (familia Rutaceae) [38], y *Conobea scoparioides* (familia Scrophulariaceae) [38], poseen compuestos con propiedades antiprotazoarias (*Leishmania* incluida).

Actividad antileishmanial ha sido descrita en extractos y compuestos de plantas del Brasil, como *Ocotea duckei* (Lauraceae) contra promastigotes de *L. amazonensis* y *L. chagasi* [39], compuestos de *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) contra promastigotes de *L. donovani* [40], extractos etanólicos de *N. falcifolia* (Lauraceae) contra promastigotes de *L. braziliensis* [40]. Especies de *Aniba* (familia Lauraceae) de Bolivia, también han sido asociadas como potenciales leishmanicidas sobre *L. braziliensis* y *L. amazonensis* [13].

Un estudio *in vitro* de actividad leishmanicida para un compuesto aislado de *Haplophyllum bucharicum* (Rutaceae) mostró, un efecto antiproliferativo sobre promastigotes de *Leishmania* por un mecanismo de acción que involucraba un arresto en fase S del ciclo celular [41]. Este mismo compuesto ejerció, una específica y fuerte actividad inhibitoria sobre amastigotes internalizados, consiguiendo una reducción mayor al 50% en el número de macrófagos infectados, propiedad que fue relacionada con la modulación de la actividad fagocítica del macrófago [41]. Diez compuestos aislados de *Nauclea diderrichii* (Rubiaceae, familia de la clase Magnoliopsida, al igual que Rutaceae), nueve glicósidos del ácido quinóico y un alcaloide, el ácido cadambínico, fueron evaluados contra *L. infantum*, de los cuales, 5 mostraron una considerable actividad antileishmanial (4 glicósidos interferían con la internalización de promastigotes), mientras el ácido cadambínico lo hacía ejerciendo una acción inmunomoduladora induciendo producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos [42]. Interesantemente el isoblograma de la asociación del ácido cadambínico con la anfotericina B, mostró una interacción sinérgica entre éstos, lo que sugiere la posibilidad de usarlos como complementos en terapias convencionales.

En un tamizaje que involucró 64 extractos obtenidos de 21 plantas (con reportado uso en la medicina tradicional en la República de Malí, como antiprotazoarios), se demostró que 4 de ellos (de 4 plantas diferentes) tenían una marcada actividad antileishmanial, de los cuales 2 (los más potentes), provenían de las especies *Bobgunnia madagascarensis* (Fabaceae) y *Z. zanthoxyloides* (Rutaceae), ambos con una inhibición mayor al 99% de la supervivencia de amastigotes de *L. major* [43].

En otro estudio, Ferreira y colaboradores presentaron en 2002, evidencia que un extracto alcaloide de la corteza de *Z. chiloperone* (Rutaceae) fue muy activo contra promastigotes de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani* [44].

Estudios *in vitro* contra diferentes cepas de *Leishmania spp.* e *in vivo* con ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis*, expuestos a la argentinilactona [compuesto derivado de *Annona haematantha* (Annonaceae)], mostró muy buenos resultados antileishmaniales, comparables con la eficacia del antimonio de meglumina [13].

A pesar de los estudios de actividad sobre las formas libres de *Leishmania*, son pocos los estudios sobre leishmanicidas que involucran un análisis sobre los efectos que directa o

indirectamente, pueden generar sobre las células hospederas (muchos se limitan a evaluar la citotoxicidad). De esta manera, otros parámetros, como el posible efecto inmunomodulador de una sustancia, juega un papel importante en entidades como leishmaniosis, los cuales no se logran definir mediante ensayos de citotoxicidad. Por ejemplo, en ensayos *in vitro* con el extracto alcaloideo de *Galipea longiflora* (Rutaceae), el cual en Bolivia ha sido usado en la medicina tradicional para el tratamiento de leishmaniosis, se observó que sobre esplenocitos murinos y células mononucleares derivadas de sangre periférica humana pre-tratados con 10 µg/mL de dicho extracto, se favorecía una reducción altamente significativa en la proliferación y en la producción de IFN-γ inducida por concavalina A o anti-CD3 [45] (citoquina importante en la señalización hacia Th1). No obstante, en las evaluaciones post-tratamiento con concavalina A o anti-CD3, no se logró observar el mismo fenómeno. A pesar de lo poco consistente del resultado, es una propiedad importante que debe ser evaluada en modelos *in vivo* para determinar el verdadero impacto de una terapia con este extracto, en el contexto de una patología como la leishmaniosis.

Bajo este panorama, los resultados obtenidos de los ensayos de compuestos aislados de plantas con actividad leishmanicida, son importantes avances que soportan la búsqueda que nuevos agentes antileishmaniales e inmunomoduladores.

1.6 Sistema inmune: susceptibilidad y resistencia a *Leishmania*

En la actualidad es bien aceptado, que en el modelo murino (con infecciones experimentales con *Leishmania spp.*), el control de la enfermedad está asociado al desarrollo de una respuesta inmune mediada por un fenotipo Th1, y que por el contrario, una respuesta polarizada hacia Th2, está ligada a una progresión de la enfermedad [29]. En principio, la promoción de una respuesta Th2 en ratones BALB/c infectados con *L. major*, está relacionada con una producción prematura de IL-4 [29, 46]. Estudios sobre BALB/c deficientes de IL-4, que se muestran resistentes a la infección con *L. major* han favorecido esta hipótesis [47]. No obstante, esta conclusión se ha visto inconsistente con estudios sobre C57BL/6 (cepa de ratones naturalmente resistentes a *L. major*), donde se evidenció que la presencia temprana de IL-4 no predispone susceptibilidad a la infección [48]. Adicionalmente un estudio sobre ratones B10.D2 (otra cepa de ratones resistentes) infectados con *L. major*, también mostró una rápida producción de IL-4 [49], lo que permite sugerir que no existe una condición simple que explique los mecanismos de resistencia y susceptibilidad, y que en últimas sería una red compleja de mediadores solubles, su regulación y actividad, la que implique el desarrollo o no de una adecuada respuesta al patógeno.

La generación de una respuesta inmune específica hacia un fenotipo Th1 o Th2 depende de la forma en que se dé la activación de los linfocitos T “naïve”, la cual requiere de la participación las células profesionales presentadoras de antígenos (CPA) como las células dendríticas. Un linfocito CD4+ T “naïve” puede diferenciarse a una célula efectora bien definida después de ser activado. El microambiente del tejido en el cual se genera la respuesta inmune específica, es crucial y regula este proceso de diferenciación vía secreción de citoquinas específicas.

La diferenciación selectiva de la célula T CD4⁺ precursora, en células efectoras Th1 y Th2, se establece durante el “priming” de éstas y es influenciado por una amplia variedad de factores extracelulares, entre estos, las citoquinas son las más efectivas [50]. Así, la producción de IL-12 por los macrófagos o células dendríticas (o CPAs) durante la respuesta inmune innata y el IFN- γ inducido por IL-12, crea un ambiente en el cual las células T CD4⁺ antígeno-específicas, son preferencialmente polarizadas hacia el fenotipo Th1, las cuales a su vez, producen IFN- γ en niveles más altos. Por otro lado, la presencia de IL-4 es crucial para la diferenciación hacia células Th2 [29].

Ahora, establecido el hecho de la importancia de la secreción de IL-12 por parte de las CPAs en el direccionamiento del “priming” de los linfocitos T “naïve” hacia Th1, y aunque el papel de la IL-4 es crucial, las CPAs están inhabilitadas para producir IL-4 [50]. De esta manera se ha reunido evidencia que sugiere que interleuquina 6 (IL-6), citoquina producida por CPAs y que promueve la diferenciación hacia Th2, logra estimular la producción de IL-4 por células T CD4⁺ “naïve” a través de NFAT (“nuclear factor of activated T cells”) [50] e incluso inhibe la polarización hacia Th1 sobre-regulando la expresión de SOCS-1 (“suppressor of cytokine signaling-1”) consiguiendo así interferir con las señales de IFN- γ [17].

Adicional a esto, otros mediadores solubles expresados por macrófagos y células dendríticas que han mostrado ser importantes en una respuesta efectiva contra *Leishmania*, entre ellos el TNF- α , se ha visto que favorece una respuesta Th1, induce la actividad leishmanicida (a través de NO) en macrófagos, e incluso se ha demostrado que induce en macrófagos resistencia a *Legionella pneumophila* [51] otro patógeno intracelular. Otro mediador soluble que cabe destacar, es la quemoquina MCP-1 (Proteína quimiotáctica de monocitos-1) también conocida como CCL2 (Quemoquina ligando 2). Las quemoquinas son proteínas pequeñas estructuralmente definidas, a las que se les han atribuido diferentes actividades biológicas, como activadores leucocitarios de mecanismos microbicidas y quimio-atrayentes, entre otras [52]. Un estudio sobre macrófagos infectados con *Leishmania* mostró, que el tratamiento con MCP-1 aumenta significativamente la producción de NO, y por ende su actividad leishmanicida [53].

Tomando en cuenta lo expuesto, es clara la necesidad de una búsqueda sistemática de nuevos agentes terapéuticos para el control de la LC producida por *L. panamensis*. Conociendo la potencialidad de las especies vegetales como una fuente abundante de sustancias con diferentes intereses farmacológicos, este proyecto propuso evaluar la actividad leishmanicida e inmunomoduladora (dado la relevancia entre la correlación respuesta inmune/respuesta terapéutica [12]) de extractos y compuestos de origen vegetal (plantas colombianas), con el objetivo de encontrar al menos un compuesto promisorio que amerite seguir siendo explorado en posteriores trabajos, que a su vez conlleven en el mediano plazo, a la descripción un nuevo agente terapéutico contra la LC.

2 Fitoquímica

La preparación, obtención, y caracterización de los diferentes extractos fue llevada a cabo en el Grupo de Investigación en Productos Naturales Vegetales del Departamento de Química (Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia), dirigido por el profesor Luís Enrique Cuca Suárez, en cabeza de los Doctores Ericsson Coy y Oscar Patiño.

2.1 Familia Lauraceae

Como se expuso anteriormente, plantas de la familia Lauraceae ya han sido evaluadas y asociadas con actividad leishmanicida. Para este trabajo plantas de las especies *Pleurothyrium* (*P.*) *cinereum* y *Ocotea* (*O.*) *macrophylla*, pertenecientes a esta familia, fueron recolectadas en la población de Tumaco (Nariño) y Nocaima (Cundinamarca), respectivamente. Un espécimen de cada planta reposa en el Herbario Nacional Colombiano (Universidad Nacional de Colombia) bajo los códigos COL518334 para *P. cinereum* y COL517191 para *O. macrophylla*.

Los extractos fueron obtenidos por el Doctor en Química Ericsson Coy Barrera, a través de maceración con etanol al 96% de muestras de hojas para cada especie. Los compuestos fueron aislados a través repetidos pasajes por columnas cromatográficas. Su caracterización y elucidación estructural fue llevada a cabo mediante diferentes técnicas espectroscópicas, las cuales fueron previamente discutidas en artículos publicados [54-56].

En la Tabla 2-1, se relacionan las especies vegetales de la familia Lauraceae y el número de extractos y compuestos que fueron evaluados en este trabajo, junto con el código que les fue asignado, en la Figura 2-1 se muestra la estructura de algunas moléculas que fueron aisladas de *O. macrophylla* y *P. cinereum*.

Tabla 2-1. Extractos y compuestos extraídos de plantas de la familia Lauraceae.

Especie vegetal	Código	Tipo de extracto y/o compuesto	Nombre común
	OmE ^a	Extracto etanólico ^c	*
	1 ^b	Lignano diarilbutánico (eritro-diasterómero)	<i>eritro-3,3',4,4',5,5'-hexametoxi-8,8'-lignano^d</i>
	2	Neolignano biciclo[3.2.1]octánico	Ocofilol A
	3	Neolignano biciclo[3.2.1]octánico	Ocofilol B
<i>O. macrophylla</i>	4	Neolignano benzofuránico	Ocofilal A
	5	Lignano diarilbutánico (treo-diasterómero)	<i>treo-3,3',4,4',5,5'-hexametoxi-8,8'-lignano^d</i>
	6	Neolignano benzofuránico	Ocofilal B
	7	Neolignano biciclo[3.2.1]octánico	2'-epi-guianina

Especie vegetal	Código	Tipo de extracto y/o compuesto	Nombre común
	PcE	Extracto etanólico	*
	8	Dihidrochalcona	Dihidroflavokavaina B
	9	Diterpeno de núcleo kaurano	Ácido kaurenóico
	10	Neolignano dihidrobenzofuránico	Mirandina A
<i>P. cinereum</i>	11	Neolignano benzofuránico	9-nor-7,8-dehidroisolicarina B
	12	Neolignano[biciclo[3.2.1]octánico	Cinerina C
	13	Lignano ariltetralínico	Pleurotetralina A
	14	Lignano ariltetralínico	(+)-Otobafenol
	15	Lignano ariltetralínico	Pleurotetralina B

Todos los extractos y compuestos de la familia Lauraceae fueron obtenidos a partir de hojas de cada espécimen vegetal. ^aA cada extracto se le asignó un código que consiste de las iniciales del nombre del espécimen vegetal y la letra E (de extracto). ^bLos compuestos se han identificado con un número natural único, fueron aislados mediante pasajes por columnas cromatográficas y la elucidación estructural se realizó por técnicas espectroscópicas. ^cLos extractos etanólicos fueron obtenidos mediante maceración con etanol al 96%. ^dNombre IUPAC en sustitución del nombre común, ya que no tienen ninguno reportado. *No requiere de nominación especial.

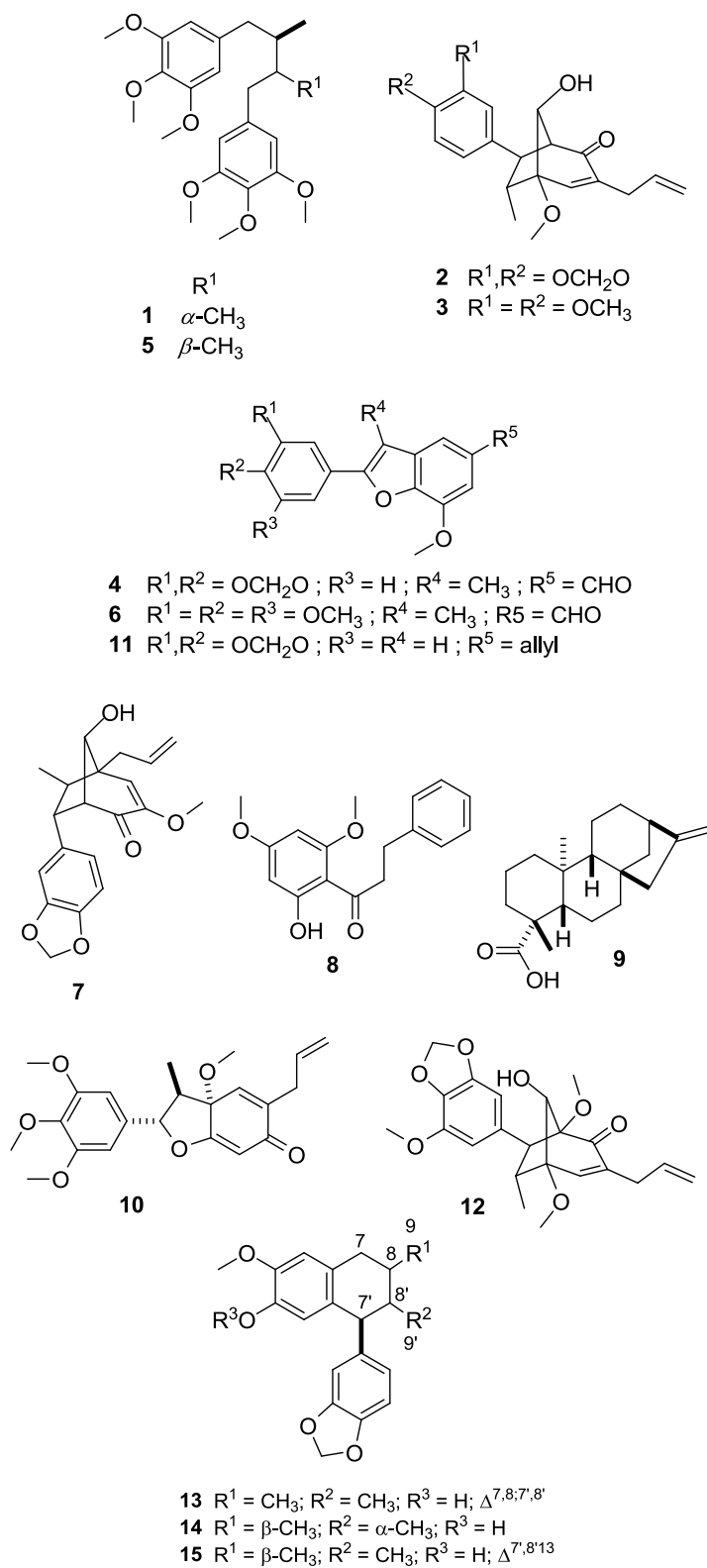


Figura 2-1. Estructura de los compuestos 1-15 aislados de plantas de la familia Lauraceae.

2.2 Familia Rutaceae

Plantas de las especies *Zanthoxylum monophyllum*, *Z. quinduense* y *Z. rhoifolium* fueron recolectadas en los municipios de San Bernardo (Cundinamarca), Albán (Cundinamarca) y en La Sierra Nevada de Santa Marta (Magdalena), respectivamente. Un espécimen de *Z. monophyllum* y otro de *Z. quinduense* fueron almacenados como parte de la colección del Herbario Nacional Colombiano (Universidad Nacional de Colombia) bajo los códigos COL517520 y COL511101, respectivamente y en el Herbario de la Universidad del Magdalena con el número de colección 4283 (UTMC-12002), reposa un espécimen de *Z. rhoifolium*.

Los extractos fueron obtenidos por el Doctor en Química Oscar Patiño Ladino, por el método de maceración con etanol al 96% de muestras de diferentes órganos de las especies colectadas.

Al extracto de corteza de *Z. monophyllum* (ZmE-1) se le realizó una extracción ácido-base de alcaloides, sucesivamente extrayendo con CHCl_3 y mezcla de CHCl_3 -EtOH 8:2. Luego de la evaporación de los solventes se obtuvieron las fracciones de CHCl_3 y CHCl_3 -EtOH [57]. De La fracción de CHCl_3 -EtOH fue aislado berberina (16) por purificación mediante cromatografía flash repetitiva sobre silica gel con los sistemas de elución CHCl_3 -MeOH (9:1 a 6:4) y CH_2Cl_2 -MeOH 9:1. De La fracción de CHCl_3 se obtuvo 2-hidroxi-4,6-dimetoxibenzaldehído(17) por purificación en cromatografía flash sobre silica gel 60 Merck (70-230 Mesh), eluyendo con CHCl_3 -MeOH en polaridad creciente (10:0 a 7:3) [57]. De *Z. monophyllum*, el extracto de tallo (ZmE-2) también fue evaluado.

De la especie *Z. quinduense* se evaluaron los extractos etanólicos obtenidos de corteza (ZqE-1), de hojas (ZqE-2) y de madera (ZqE-3). A los extractos ZqE-1 y ZqE-2 se tiene reportes de estudios fitoquímicos que indican que contienen alcaloides de diferentes tipos, triterpenos, esteroides, lignanos, felinpropenos y benzenoides [58, 59].

De *Z. rhoifolium* se evaluó el extracto etanólico obtenido de la corteza (ZrE), de la cual para la especie colombiana no se cuenta con reportes de estudios fitoquímicos.

En la Tabla 2-2, se relaciona el número de sustancias obtenidas, el espécimen vegetal (incluyendo el órgano de la planta del cual se obtuvieron los productos analizados) y el código que les fue asignado. En la Figura 2-2 se presentan las estructuras químicas de los compuestos de Rutaceae que fueron evaluados aquí.

Tabla 2-2. Extractos y/o compuestos obtenidos de plantas de la familia Rutaceae

Especie vegetal	Código	Tipo de extracto y/o compuesto	Nombre común
<i>Z. monophyllum</i>	ZmE-1 ^a	Extracto etanólico ^c (Corteza) ^d	*
	ZmE-2	Extracto etanólico(Tallo)	*
	16 ^b	Alcaloide berberínico (Corteza)	Berberina
	17	Aldehído aromático (Corteza)	2-hidroxi-4,6-dimetoxibenzaldehído ^e
<i>Z. quinduense</i>	ZqE-1	Extracto etanólico (Corteza)	*

Especie vegetal	Código	Tipo de extracto y/o compuesto	Nombre común
	ZqE-2	Extracto etanólico(Hojas)	*
	ZqE-3	Extracto etanólico(Madera)	*
<i>Z. rhoifolium</i>	ZrE	Extracto etanólico (Corteza)	*

^aA cada extracto se le asignó un código que consiste de las iniciales del nombre del espécimen vegetal, más la letra E y un número entero si había más de un extracto para la misma especie. ^bLos compuestos se han identificado con un número natural único, fueron aislados mediante pasajes por columnas cromatográficas y la elucidación estructural se realizó por técnicas espectroscópicas. ^cLos extractos etanólicos fueron obtenidos mediante maceración con etanol al 96%. ^dEntre paréntesis se describe la parte de la planta de la cual se obtuvo el extracto y/o compuesto. ^eNombre IUPAC en sustitución del nombre común, ya que no tienen ninguno reportado.*No requiere de nominación especial.

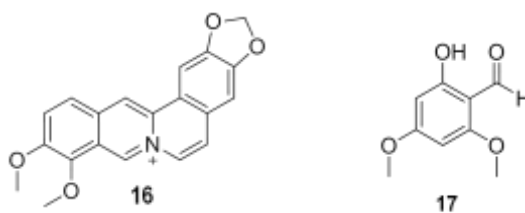


Figura 2-2. Estructura química de los compuestos 16-17 aislados de plantas de la familia Rutaceae.

3 Actividad Biológica

Entre las dificultades que actualmente se encuentran asociadas a la terapéutica contra la leishmaniosis, la toxicidad se destaca como una principal desventaja. Adicionalmente, por tratarse de un parásito intracelular obligado, cualquier molécula ineludiblemente deberá interactuar en primera instancia con la célula hospedadora antes de su encuentro con el parásito.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, se propuso evaluar el potencial citotóxico de los extractos y compuestos contra macrófagos (células que sirven como hospedadores definitivos) murinos de la línea celular J774, inicialmente y macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica (MDMSP), posteriormente (debido a las dificultades del proceso de análisis de la infección con J774, véase metodología más adelante).

Seguido a esto, se realizaron los ensayos de actividad leishmanicida *in vitro*, primero sobre células en la forma promastigote del parásito y luego sobre macrófagos infectados.

3.1 Metodología

En este punto es importante explicar, que inicialmente se había planteado hacer las evaluaciones únicamente sobre macrófagos J774, no obstante, durante el desarrollo de los diferentes experimentos se encontraron dos principales dificultades al momento de evaluar la actividad leishmanicida sobre células infectadas: 1) por tratarse de una línea celular, las células que después de estar expuestas al parásito no se lograron infectar, continuaban su ciclo celular, lo cual llevó a observar reducciones en los porcentajes de infección en los controles de células no tratadas, lo que repercutía en la confiabilidad de los resultados que se obtuvieran y, 2) se presentaban dificultades considerables al momento de evidenciar la infección, la cual se planteó en primera instancia, a través de una tinción con Giemsa (técnica estándar para este tipo de ensayos) y posteriormente mediante citometría de flujo, valiéndose de un cepa de *L. panamensis* transfectada con la proteína verde de fluorescencia (*Green Fluorescence Protein*, GFP). Sin embargo, durante los ensayos preliminares, se pudo observar que en las evaluaciones con Giemsa, el procedimiento era complejo, extensamente laborioso y con baja reproducibilidad, consideraciones que han sido ampliamente descritas [60-63], por su parte, para la citometría de flujo se contemplaba que las células ofrecían una gran ruidos de fluorescencia (autofluorescencia), que sumado a lo comentado en la primera dificultad hacía que los alcances de estos resultados, se mostrasen bastante limitados.

Con todo lo anterior, se planteó la búsqueda de alternativas que permitieran resolver las dificultades descritas. Con respecto a la primera, se propuso hacer los ensayos sobre cultivos primarios, obteniendo macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (MDMSP) a partir de muestras de voluntarios sanos, donadas por el Banco de Sangre de la Cruz Roja Colombiana. Es de resaltar, que esta fracción es generalmente desechada, dada su potencial reactividad durante los procesos de transfusión. Estos macrófagos, fueron utilizados para los ensayos de efectividad y en algunos ensayos de citotoxicidad que

se consideraron pertinentes. Posteriormente, quedaba desarrollar una estrategia que permitiera evidenciar la infección y atendiendo esta necesidad, se propuso teñir células infectadas con una molécula fluorescente que marcará el ácido desoxirribonucleico (ADN), buscando observar a través de microscopía con fluorescencia el material genético de las células hospedadoras y de los parásitos que contuvieran.

Considerando lo anterior, a continuación se describen los procedimientos experimentales que se llevaron a cabo para evaluar la actividad biológica de los diferentes extractos y compuestos, enmarcada en la estimación del potencial citotóxico y actividad antileishmanial.

3.1.1 Cultivos Celulares

- *Macrófagos murinos J774*

Fueron cultivados en cajas de cultivo de 25 cm² (Techno Plastic Products AG, Suiza) estériles en medio RPMI-1640 (Gibco BRL-Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) suplementado con 5% de suero fetal bovino SFB (CRPMI), en una incubadora de CO₂ (5%) a 37°C. El medio de cultivo fue cambiado en la medida que fue requerido, tomando como indicador el color del medio (dado por el rojo de fenol, según el pH). Se mantuvieron hasta alcanzar una confluencia entre el 80 y 90%. En este punto se retiró el medio, se lavó con solución salina para retirar células en suspensión y se raspó con un *cell scraper* (Techno Plastic Products AG, Suiza) para la obtención de las células, a las cuales se midió viabilidad por exclusión con azul de tripán (50 µL del cultivo en 50 µL de azul de tripán), y se cuantificaron en cámara de Neubauer para calcular las cantidades correspondientes para cada ensayo.

- *Macrófagos Derivados de Monocitos de Sangre Periférica (MDMSP)*

Se obtuvieron monocitos de sangre periférica a partir de la separación de glóbulos blancos por centrifugación en gradiente de Ficoll (Ficoll-Hypaque, Sigma Aldrich–St Louis, USA) a 2800 rpm durante 30 minutos. Las células fueron obtenidas a partir de muestras de voluntarios sanos donadas por el Banco de Sangre de la Cruz Roja Colombiana. La fracción de glóbulos blancos, fue lavada tres veces en tampón salino de fosfatos (PBS) mediante centrifugación y posteriormente sembrada en cajas de Petri de Poliestireno (BD Biosciences, Falcon) con medio RPMI 1640 (Gibco BRL-life Technologies Inc, Grand Island, NY) durante 2 horas de incubación. Al cabo de este periodo, la fracción no adherente fue removida y la porción de monocitos adheridos, fue cultivada por 7 días adicionales con reemplazo de medio cada 48 horas, por medio fresco. Luego de este tiempo, los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (MDMSP) fueron recolectados y utilizados en los ensayos correspondientes.

- *Parásitos de Leishmania spp.*

Dos cepas de promastigotes, una de *L. panamensis*, MHOM/CO/87/UA140 y otra de *L. braziliensis* MHOM/CO/87/CL250 fueron cultivadas en cajas de cultivo de 25 cm² (Techno Plastic Products AG, Suiza), en medio CRPMI suplementado con 1% L-glutamina, a 27°C en condiciones de humedad y gasificación ambientales. Los parásitos fueron mantenidos entre 5 y 6 mL de medio durante 6 días, posterior a los cuales se

pasaron a tubos de 15 mL para centrifugar (1500 rpm) y cambiar por medio fresco. Una alícuota de 50 μ L del cultivo se adicionó a 50 μ L de solución salina con 2% de Giemsa y 2% de formol (con el objetivo de inmovilizar los parásito y permitir el conteo) para cuantificar y realizar los cálculos relacionados con el desarrollo de cada ensayo.

3.1.2 Preparación de extractos y compuestos

Los diferentes extractos y compuestos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta su completa disolución. Posteriormente, se procedió a ajustar su concentración con adición de RPMI, teniendo en cuenta que en los ensayos biológicos no fuera superior al 1% DMSO [64], concentración a la cual en ensayos previos se ha demostrado que no tiene ningún efecto significativo sobre los modelos (J774, MDMSp, promastigotes de *L. panamensis* y *L. braziliensis*) empleados en nuestro grupo de investigación.

3.1.3 Ensayos de citotoxicidad

La toxicidad de los extractos y compuestos se determinó en un modelo *in vitro*, a través de la capacidad que estos tenían para inhibir la actividad metabólica de células de la línea J774 y de los MDMSp, evento que se relaciona directamente con la viabilidad celular. El cálculo de la viabilidad celular se hizo mediante la prueba de resazurina basado en la metodología descrita y publicada previamente [65], con pequeñas variaciones. La resazurina, también conocida con el nombre de Alamar Blue, funciona como un indicador de óxido-reducción y/o actividad metabólica. La resazurina (de color azul), es reducida a un compuesto fluorescente llamado resorufina (de color rosado) por células metabólicamente activas (células viables) [66].

Con el fin de evaluar la susceptibilidad de los macrófagos J774 y los MDMSp a los extractos y compuestos de las plantas de las familias Lauraceae y Rutaceae, 10^4 células/pozo contenidas en 100 μ L de medio CRPMI fueron sembradas en una caja de 96 pozos fondo plano (Techno Plastic Products AG, Suiza) y se incubaron por 18 a 24 horas para permitir una óptima adhesión. Pasado este tiempo, se adicionaron 100 μ L de CRPMI con diferentes concentraciones de los extractos y/o compuestos a evaluar. Ocho concentraciones de cada sustancia a evaluar (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 y 7.8125 μ g/mL para los extractos y 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.5625 μ g/mL en el caso de los compuestos) fueron obtenidas por dilución seriada 1:2 en placas de 96 pozos fondo en “U” (Techno Plastic Products AG, Suiza).

Como controles se emplearon pozos con células sin tratamiento y pozos con CRPMI únicamente. Adicionalmente, algunas células fueron expuestas a 2% de DMSO (el cual sirvió como solvente de los extractos y compuestos). En los grupos experimentales, el DMSO proveniente de las sustancias a evaluar no fue mayor al 1% en ningún caso. Como medicamento de referencia con actividad leishmanicida se utilizó isetionato de pentamidina (Pentacarinat[®], Sanofi-Aventis, UK). La concentración inicial fue de 50 μ g/mL, un poco más de 3 veces la CL_{50} sobre macrófagos J774 que se ha reportado [67], esto con el fin de que las concentraciones por encima de la CL_{50} proporcionen valores de inhibición que al momento de graficar sean adecuados para un correcto cálculo.

Los grupos experimentales y controles fueron incubados por 72 horas, a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, los sobrenadantes fueron recolectados y criopreservados para posteriores evaluaciones. Cada pozo fue reconstituido con 100 µL de CRPMI fresco al cual se le adicionó 50 µL de RPMI con resazurina a 132 µM, para un volumen final de 150 µL a 44 µM de resazurina [65]. Luego de 4 horas, se evaluó la reducción de resazurina a resorufina, en un lector de placas *Tecan GENios Microplate Reader* (Tecan, Austria), con excitación a 535 nm y emisión a 590 nm, por medio del software *Magellan* versión 4.0 (Tecan, Austria).

3.1.4 Ensayos de actividad Leishmanicida sobre promastigotes

Se evaluó el potencial leishmanicida de los extractos y compuestos sobre la forma libre de *L. panamensis* y *L. braziliensis*, a través de su capacidad para inhibir la actividad metabólica de los promastigotes.

A partir de un cultivo celular de promastigotes de cada especie, 100 µL con 2×10^5 parásitos fueron sembrados en cada pozo de una caja de 96 pozos fondo plano, a la cual previamente se le había adicionado las diferentes concentraciones de los extractos y compuestos que fueron evaluados, para un volumen final de 200 µL en cada pozo. Al igual que para los ensayos de citotoxicidad anteriormente descritos, se usaron ocho concentraciones obtenidas a partir de diluciones seriadas 1:2. La concentración inicial de la cual se consiguieron las diluciones seriadas, fue seleccionada teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de citotoxicidad, no obstante, con el objetivo de abarcar el rango más amplio de concentraciones, se partió de una concentración próxima, pero por debajo de la CL₅₀ calculada.

Como controles nuevamente fueron empleados pozos con promastigotes sin tratamiento, pozos con CRPMI únicamente y en algunos ensayos, parásitos expuestos a 2% de DMSO, para descartarlo como variable. Como medicamento de referencia se utilizó el isetionato de pentamidina (Pentacarinat®), molécula con efecto antileishmanial utilizado en el tratamiento contra leishmaniosis [68]. Habitualmente la pentamidina es empleada como control positivo en este tipo de ensayos [14], teniendo en cuenta que a diferencia de las sales antimoniales pentavalentes, como el antimoniato de meglumina, utilizadas como medicamentos de primera línea en el tratamiento contra la leishmaniosis, no es un profármaco, por lo tanto no requiere ser metabolizada y actúa directamente sobre el parásito [69].

Los ensayos fueron incubados por 72 horas a 26°C en condiciones de gasificación ambientales. Pasado este tiempo a cada pozo se le adicionó 50 µL de RPMI con resazurina a 220 µM, para un volumen final de 250 µL a 44 µM de resazurina. 36 horas después se evaluó la reducción de resazurina a resorufina, utilizando de nuevo un lector de placas *Tecan GENios Microplate Reader* (Tecan Trading AG, Suiza) asistido por el programa *Magellan* versión 4 (Tecan Trading AG, Suiza).

3.1.5 Actividad leishmanicida sobre amastigotes internalizados

Tomando en cuenta lo costoso y dispendioso en que consiste la obtención de los MD MSP, estos ensayos fueron realizados utilizando únicamente la cepa MHOM/CO/87/UA140 de *L. panamensis*, principal agente etiológico de la mayoría de casos de LC en Colombia.

Luego de la obtención de los MD MSP, 2×10^4 células/pozo fueron sembradas en cajas de 24 pozos (Techno Plastic Products AG, Suiza) y se incubaron durante 18 horas aproximadamente para permitir una óptima adherencia. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 5×10^5 promastigotes/pozo en fase estacionaria (6 días de cultivo), estadio más virulento del parásito [1], para una proporción macrófago:parásito de 1:25, con la cual se demostró, en ensayos previos, se conseguía una infección superior al 50%. Los ensayos se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas para propiciar la infección [70]. Pasado este tiempo, los pozos fueron lavados para retirar los parásitos no internalizados, posteriormente se restauró un volumen final de 400µL/pozo y se procedió a adicionar 4 diferentes concentraciones de extractos y/o compuestos a evaluar. Los ensayos fueron incubados por 48 horas, luego de este periodo los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados y criopreservados para posteriores ensayos.

Como controles se emplearon pozos con células no expuestas al parásito, células infectadas sin ningún tratamiento y células infectadas tratadas con estibogluconato de sodio, fármaco de primera línea usada en tratamientos contra leishmaniosis [5].

3.1.6 Evaluación *in vitro* de la infección de MD MSP

Como se expuso al comienzo de la sección de metodología, una de las dificultades que se presentó durante el desarrollo experimental de este trabajo, radicó en la evaluación fiable de la infección, la cual generalmente se hace mediante una tinción con tintes policromáticos como el Giemsa (que se basan en el principio de Romanowsky para teñir los ácidos nucleicos). No obstante, son diversos los reportes que describen numerosas y considerables dificultades, tales como, la estructura de los colorantes que componen el tinte, el pH del tampón, la concentración del colorante y el tiempo de incubación de la tinción [60]. También se debe tener en cuenta, que cada vez que se realiza una tinción, se debe preparar una “solución de trabajo”, verificando en un ensayo previo el resultado de dicha solución, ya que se ha reportado que no es muy estable y que después de cerca de tres horas, se forman complejos que se precipitan y fallan al tratar de conseguir una tinción [61]. Además, se ha visto que existen importantes diferencias entre los colorantes producidos por diferentes casas comerciales, que se manifiestan en cambios en los resultados de la tinción. En relación con este punto, Mashall y colaboradores evaluaron 11 colorantes de Giemsa, entre otras tinciones policromáticas, producidos por diversas casas comerciales y concluyeron que, las propiedades de tinción son extremadamente variables entre ellas [62]. También es reconocido, que existe gran variabilidad interobservador en los conteos de un mismo ensayo [63]. Todos estos reportes, justificaron la búsqueda de nuevas herramientas para la evaluación de parasitosis *in vitro*. Por tal razón, como parte de los resultados de este trabajo, se logró estandarizar un nuevo procedimiento para la cuantificación de parasitosis *in vitro* utilizando el colorante fluorescente SYBR® Safe sobre los MD MSP infectados con *L. panamensis*.

El procedimiento consiste en adicionar SYBR® Safe diluido en el sobrenadante de las células infectadas (5X concentración final) y se mantiene en obscuridad durante 5-10 minutos, pasado este tiempo se alista para leer en un microscopio invertido con sistema de fluorescencia (Carl Zeiss Axiovert 40 CFL, Alemania) para proceder al conteo y captura de imágenes (Cámara, Canon Power Shot). Se contaron por lo menos 100 células para determinar el porcentaje de infección.

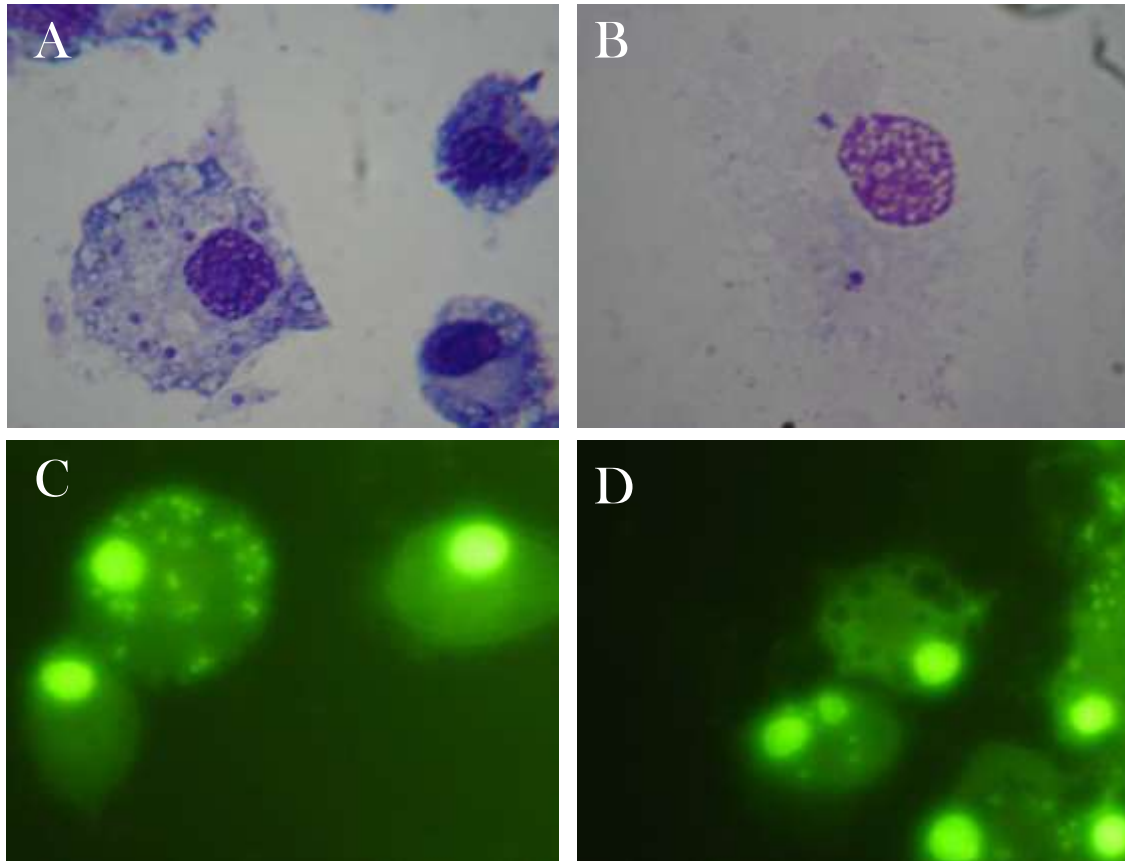


Figura 3-1. Tinción de macrófagos infectados con *L. panamensis*. A, B. Dos ensayos independientes de macrófagos infectados con *L. panamensis*, observados luego de tinción con Giemsa con microscopia de luz. C, D. Macrófagos infectados con *L. panamensis*, observados luego de tinción con SYBR® Safe y excitación UV en un microscopio invertido de fluorescencia. D. Macrófagos infectados expuestos a un tratamiento de 48 h con estibogluconato de sodio.

En la Figura 3-1, se presentan fotografías de MDMSP infectados con *L. panamensis* y teñidos por el convencional Giemsa y por SYBR® Safe, donde se puede apreciar que en una tinción con Giemsa no hay uniformidad, en los colores que pueden tomar las células (comparando las Figuras 3-1A y 3-1B). Adicionalmente, nótese en la Figura 3-1B que no hay posibilidad de distinguir los márgenes de la celular. Por otro lado, en las Figuras 3-1C y 3-1D, que muestran MDMSP infectados con *L. panamensis*, sin tratamiento y tratados con estibogluconato de sodio, respectivamente, se puede observar con claridad el margen de las células y los parásitos que se encuentran dentro de este. Incluso en la Figura 3-1D, se alcanzan a definir algunos espacios que podrían corresponder a vacuolas parasitóforas,

ya que este tipo de imágenes solo se presentaban en pozos tratados con sustancias que fueron efectivas y en el control positivo.

Adicionalmente para validar la técnica de SYBR® Safe con respecto al Giemsa, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre los resultados obtenidos por ambos métodos en un mismo ensayo y se encontró un $r = 0.979$ ($p=0.004$). A partir de estos resultados, la evaluación del porcentaje de infección de los ensayos de actividad leishmanicida sobre MDMSF infectados, se realizó mediante coloraciones con SYBR® Safe.

3.1.7 Procesamiento y análisis de datos

Con los datos obtenidos de estos ensayos se procedió a la construcción curvas dosis-respuesta, las cuales, son comúnmente resumidas con la expresión de la concentración a la cual se puede observar el 50% del efecto biológico en cuestión. Para términos prácticos, una concentración letal 50 (CL₅₀) corresponde a la concentración en donde se observa una inhibición del 50% de la viabilidad de la población celular que se expuso a los diferentes tratamientos en los ensayos de citotoxicidad. Por su parte la concentración efectiva 50 (CE₅₀), puede representar la concentración en donde se observa una inhibición del 50% de viabilidad de los parásitos que fueron tratados en los ensayos de efectividad sobre promastigotes o a la concentración en la cual se obtiene un reducción del 50% del número de células infectadas con respecto al control (ensayos de efectividad sobre MDMSF infectados). Se denomina efectiva ya que concierne a la actividad biológica deseada.

Para calcular las CL₅₀ y CE₅₀ en los ensayos de citotoxicidad y efectividad sobre promastigotes, respectivamente, se tuvo en cuenta que la intensidad de fluorescencia emitida por la resorufina es proporcional al número de células viables, de esta manera, los datos de unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) arrojados por el lector de placas, fueron corregidos con respecto a las UAF emitidas por los pozos que contenían solo medio con resazurina (*“background”* de fluorescencia). Seguido a esto, los datos fueron normalizados con referencia al promedio de los pozos que contenían células sin tratamiento, los cuales fueron tomados como la intensidad máxima de fluorescencia (control de máxima viabilidad) y el porcentaje de supervivencia se determinó con la siguiente ecuación:

$$Sv = \frac{F_p \times 100}{F_{cv}}$$

Donde Sv es el porcentaje de supervivencia, F_p representa las UAF de los pozos problema (a los cuales se iba a calcular el porcentaje de supervivencia) y F_{cv} era la media de las UAF de los pozos que funcionaron como control de máxima viabilidad.

En el caso de la CE₅₀ para los ensayos de MDMSF infectados, se tomó como el 100% de infección, la parasitosis que se contó en el control (pozos de células infectadas sin tratamiento) y con respecto a este se calculó, el porcentaje de infección en los pozos que fueron tratados, utilizando la siguiente ecuación:

$$Pi = \frac{P_s \times 100}{P_c}$$

Donde, P_i es el porcentaje de infección, P_e es la parasitosis contada para un determinado pozo y P_c es la media de la parasitosis que se calculó para el grupo control (pozos de células infectadas sin tratamiento).

Las CL_{50} y CE_{50} fueron calculadas gráficamente utilizando el software estadístico GraphPad Prism versión 5.00 (GraphPad Software, USA) aplicando un modelo de *pendiente variable* de regresión no lineal (basado en un modelo logístico de cuatro parámetros, ecuación más común para datos de dosis-respuesta *in vitro* [71]), el cual se rige por la siguiente ecuación:

$$y = \frac{100}{[1 + 10^{(\log IC_{50} - x) \times Hs}]}$$

Donde, x representa el logaritmo de la concentración, y la respuesta normalizada, y Hs el valor de la pendiente, el cual varía dependiendo del comportamiento de los datos (calculada por el programa).

Los criterios para aceptación de una CL_{50} y/o CE_{50} fueron definidos de acuerdo al manual para ensayos del “NIH Chemical Genomics Center”, estableciendo un MSR (*minimum significant ratio*) menor o igual a 3 para dar por válido el ensayo y aceptando que este corresponde a un error estándar (ES) menor al 40% de la CL_{50} y/o CE_{50} calculada en un determinado ensayo [71].

Finalmente, obtenidos los datos de citotoxicidad y efectividad se procedió a calcular el índice de selectividad (IS), el cual se define por la siguiente ecuación:

$$IS = \frac{CL_{50}}{CE_{50}}$$

Donde, CL_{50} se denomina a la concentración letal 50 y CE_{50} es la concentración efectiva 50, la cual puede corresponder a la concentración en donde se observa una inhibición del 50% de viabilidad en los ensayos de efectividad sobre promastigotes o a la concentración a la cual se obtiene una reducción del 50% del número de células infectadas con respecto al control, en los ensayos de efectividad sobre MDMSF infectados.

3.2 Resultados y Discusión

Teniendo en cuenta el mecanismo fisiopatológico para la leishmaniosis y ante la necesidad de la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas más eficaces y seguras para su control, es fundamental analizar la inocuidad y especificidad de la actividad de los candidatos a fármacos antileishmaniales sobre macrófagos y parásitos internalizados, respectivamente. Con el objeto de evaluar el efecto citotóxico sobre la célula hospedadora de *Leishmania spp.*, dos extractos etanólicos y 15 compuestos (5 lignanos, 8 neolignanos, una dihidrochalcona y un diterpeno) de la familia Lauraceae y 6 extractos etanólicos y dos compuestos (un alcaloide berberínico y un aldehído aromático) de plantas de la familia Rutaceae fueron evaluados en ensayos de citotoxicidad sobre macrófagos murinos de la línea celular J774, tal como se describió atrás en el punto 3.1.2 del apartado de metodología.

De las 25 sustancias evaluadas, entre extractos y/o compuestos, a 14 fue posible calcularles una CL_{50} en los ensayos de citotoxicidad, partiendo de una concentración máxima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de extracto y 200 $\mu\text{g/mL}$ de compuesto (véase punto 3.1.2). Las 11 restantes no lograron inhibir el 50% de la población celular, por lo menos en el rango de concentraciones que fueron empleadas para los experimentos. Luego de obtenidos los datos del perfil citotóxico de cada extracto y compuesto, se procedió a evaluar su potencial leishmanicida, para lo cual de manera preliminar, promastigotes (forma libre del parásito) de *L. panamensis* fueron expuestos a diferentes concentraciones de cada extracto y molécula a evaluar, adicionalmente con el objetivo de conocer el posible espectro de la actividad antileishmanial, una cepa de promastigotes de *L. braziliensis* (principal agente etiológico en Suramérica de LC y segundo en Colombia) también fue evaluada. En la Tabla 3-1 se muestra el resumen de estos ensayos.

Tabla 3-1. Resultados de los ensayos de citotoxicidad y efectividad sobre promastigotes de *L. panamensis* y *L. braziliensis*.

No.	Código ^a	J774	<i>L. panamensis</i>	<i>L. braziliensis</i>		
		CL_{50}^b	CE_{50}^b	IS ^c	CE_{50}	IS
1	OmE	204.5 \pm 79.9	98.03 \pm 19.87	2	85.7 \pm 22.88	2
2	1	68.70 \pm 19.83	26.65 \pm 2.58	3	>100 \pm 0	~1
3	2	>200 \pm 0	>100 \pm 0	~2	>100 \pm 0	~2
4	3	>200 \pm 0	>100 \pm 0	~2	>100 \pm 0	~2
5	4	>200 \pm 0	58.93 \pm 32.22	≥3	>100 \pm 0	~2
6	5	>200 \pm 0	>100 \pm 0	~2	>100 \pm 0	~2
7	6	147.03 \pm 45.87	34.02 \pm 14.88	4	36.26 \pm 11.41	4
8	7	>200 \pm 0	>100 \pm 0	~2	>100 \pm 0	~2
9	PcE	165.13 \pm 13.71	>50 \pm 0	<4	>200 \pm 0	<1
10	8	49.02 \pm 7.24	19.94 \pm 3.31	2	25.04 \pm 15.05	2
11	9	30.86 \pm 0.54	25.35 \pm 9.21	1	45.39 \pm 4.77	1
12	10	>200 \pm 0	>100 \pm 0	~2	>100 \pm 0	~2
13	11	>200 \pm 0	>100 \pm 0	~2	>100 \pm 0	~2
14	12	>200 \pm 0	>100 \pm 0	~2	>100 \pm 0	~2
15	13	>200 \pm 0	>100 \pm 0	~2	>100 \pm 0	~2
16	14	>200 \pm 0	31.11 \pm 13.93	≥6	>100 \pm 0	~2
17	15	>200 \pm 0	58.45 \pm 3.34	≥3	>100 \pm 0	~2
18	ZmE-1	70.76 \pm 15.49	2.58 \pm 0.16	27	7.61 \pm 0.88	9
19	ZmE-2	266.17 \pm 38.87	25.01 \pm 7.45	11	22.89 \pm 2.52	12
20	16	23.53 \pm 4.17	0.56 \pm 0.16	42	1.83 \pm 0.07	13
21	17	132.30 \pm 35.61	135.53 \pm 13.29	1	118.17 \pm 11.27	1
22	ZqE-1	60.99 \pm 15.68	0.52 \pm 0.21	118	2.02 \pm 0.14	30
23	ZqE-2	190.03 \pm 22.19	>500 \pm 0	<1	>500 \pm 0	1
24	ZqE-3	288.17 \pm 39.42	23.73 \pm 8.66	12	123.13 \pm 26.14	2
25	ZrE	167.63 \pm 33.85	17.17 \pm 0.56	9	34.57 \pm 20.68	4
Isetionato de pentamidina		7.32 \pm 1.51	0.46 \pm 0.14	16	0.59 \pm 0.2	12

^aCodificación de la sustancia, para más detalle véase Tabla 2-1 y 2-2, ^bLos datos de CL_{50} y CE_{50} están dados en $\mu\text{g/mL}$, ^cEn negrilla se resaltan los IS superiores a 2, que permiten sugerir una actividad promisorio y selectiva para *Leishmania* [72], ^dDesviación estándar.

Tanto los extractos como los compuestos derivados de las tres especies del género *Zanthoxylum* presentaron actividad citotóxica contra J774 (véase Tabla 3-1). Las CL_{50} de

los extractos oscilaron entre los 60 y los 290 $\mu\text{g/mL}$, por su parte las CL_{50} de los compuestos 16 y 17 estuvieron sobre los 20 y 120 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, muy por encima de los 7.32 $\mu\text{g/mL}$ calculada para la pentamidina, usualmente empleada en tratamientos antileishmaniales. Por otro lado, de los extractos y/o compuestos provenientes de plantas de la familia Lauraceae, OmE y PcE presentaron efectos citotóxicos para los macrófagos J774. No obstante, más del 70% de los compuestos aislados a partir de éstos (7 del extracto OmE y 8 de PcE) no mostraron actividad frente a los macrófagos J774 y sólo los compuestos 1, 6, 8 y 9 (los dos primeros de OmE y los restantes de PcE) fueron tóxicos para J774. Sin embargo, nuevamente todos por arrojaron resultados por encima de la CL_{50} para la Pentamidina. En las Figuras 3-2, 3-5 y 3-9, se presentan los resultados de los experimentos representativos de citotoxicidad sobre macrófagos J774 para las sustancias obtenidas de plantas de *O. macrophylla*, *P. cinereum* y *Zantonzylum spp.*, respectivamente.

En los ensayos de actividad leishmanicida sobre promastigotes de *L. panamensis*, 6 extractos y 9 compuestos mostraron ser activos para inhibir los parásitos por encima del 50% con respecto al control, permitiendo calcular para estas las CE_{50} . De estos, 1 extracto y 7 compuestos provenían de especímenes de lauráceas y los 5 extractos y 2 compuestos restantes, eran derivados de rutáceas. En las Figuras 3-3, 3-6 y 3-10, se encuentran resultados representativos de los experimentos de efectividad de cada sustancia evaluada. Por otro lado, cuando los ensayos se realizaron utilizando la cepa *L. braziliensis* solo a 11 de los extractos y compuestos evaluados se les pudo calcular una CE_{50} (véase Tabla 3-1). Algunas gráficas representativas de los ensayos se muestran en las Figuras 3-4, 3-7 y 3-11. Interesantemente, los extractos y compuestos derivados de plantas de la familia Rutaceae se mostraron más activos que los de Lauraceae y solo el extracto ZqE-2, se mostró inactivo contra *L. panamensis* y *L. braziliensis*, en el rango de concentraciones evaluadas. Los extractos y compuestos de Rutaceae se mostraron leishmanicidas contra ambas especies de *Leishmania*, que a diferencia de los extractos y compuestos de Lauraceae, solo la mitad de los que fueron efectivos contra *L. panamensis* consiguieron inhibir promastigotes de *L. braziliensis*, sugiriendo una posible mayor susceptibilidad de *L. panamensis* a los extractos y compuestos evaluados. A pesar que los compuestos derivados de lauráceas, exhibieron un menor efecto leishmanicida comparado con los de rutáceas, en las moléculas derivadas de Lauraceae, se pudieron describir relaciones de estructura-actividad bastante llamativas que serán discutidas con más detalle posteriormente.

Como se había descrito atrás en el apartado de metodología, no fue posible evaluar la actividad leishmanicida sobre macrófagos J774 infectados y por esta razón la evaluación de la actividad leishmanicida sobre amastigotes internalizados fue realizada sobre MDMSp, infectados con el parásito. Teniendo claro que los resultados de citotoxicidad de las J774 no podían ser utilizados para calcular los IS en estos ensayos (por tratarse de macrófagos de una especie diferente), se requería realizar nuevamente ensayos de citotoxicidad sobre los macrófagos humanos. No obstante, se tuvo en cuenta que en la búsqueda de principios activos que puedan ser propuestos para el desarrollo de medicamentos antileishmaniales, una condición que se consideraría adecuada, es que dicha actividad leishmanicida fuese del más amplio espectro y que no estuviese limitada por la especie involucrada en la infección. Con esta consideración y teniendo en cuenta el elevado costo y lo dispendioso que resulta el proceso de diferenciación de macrófagos a partir de sangre periférica de humanos, los experimentos de citotoxicidad sobre MDMSp fueron realizados teniendo en cuenta aquellos extractos y compuestos que se mostraron activos

contra ambas especies de *Leishmania*. Adicionalmente, los ensayos de efectividad sobre parásitos internalizados fueron realizados sobre MDMSP infectados con *L. panamensis*, ya que es la principal especie responsable de los casos de leishmaniosis en nuestro país.

Es importante tener en cuenta, que el IS es un buen parámetro para informar acerca del potencial de seguridad de una sustancia y por ende de lo promisorio de su actividad. En algunos estudios se consideran seguras y eficaces, aquellas sustancias que presenten una CL_{50} mayores a 100 $\mu\text{g/mL}$ y CE_{50} menores a 50 $\mu\text{g/mL}$ [72], de lo se puede inferir que por lo menos, debe existir una razón de 2 entre las concentraciones citotóxicas y efectivas de la sustancia en mención. Por tal razón los extractos y compuestos que mostraron un IS igual o superior a 2, fueron considerados como promisorios en este estudio.

3.2.1 Actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y compuestos de la familia Lauraceae

Sólo para los compuestos 1, 6, 8, 9 y los extractos OmE y PcE, fue posible reportar una CL_{50} sobre J774, las demás moléculas, no indujeron una inhibición del crecimiento celular por encima del 50%, en el rango de concentraciones evaluadas. Para los ensayos de citotoxicidad sobre MDMSP, se analizaron el extracto OmE y las moléculas 6 y 8 ya que se mostraron selectivas contra las dos especies de *Leishmania* utilizadas en los ensayos sobre promastigotes. Adicionalmente, se evaluó el potencial citotóxico de (+)otobafenol (14) teniendo en cuenta que tuvo un $IS \geq 6$, aunque fue activo solo contra *L. panamensis*. Sobre los MDMSP, sólo el extracto OmE conservó la citotoxicidad con una concentración que estadísticamente no difiere de la reportada para J774; por su parte los compuestos fueron inocuos para los MDMSP, incluso el ocofilal B (6), que había sido tóxico para las J774. Sin embargo, cabe anotar que tales concentraciones, comparadas con la obtenida para la pentamidina, fueron más altas para conseguir el mismo efecto, tal como se observa en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2. Citotoxicidad de extractos y compuestos de plantas Lauraceae sobre macrófagos J774 y MDMSP.

No.	Código	J774		MDMSP ^a	
		CL_{50}	ES^b	CL_{50}	ES
1	OmE	204.5 \pm 79.9	14,31 \pm 2,27	168,45 \pm 31,61	36,77 \pm 11,48
2	1	68.70 \pm 19.83	11,86 \pm 2,03	NE ^c	*
3	2	>200 \pm 0	*	NE	*
4	3	>200 \pm 0	*	NE	*
5	4	>200 \pm 0	*	NE	*
6	5	>200 \pm 0	*	NE	*
7	6	147.03 \pm 45.87	26,81 \pm 23,66	>200 \pm 0.00	*
8	7	>200 \pm 0,00	*	NE	*
9	PcE	165.13 \pm 13.71	17,74 \pm 3,48	NE	*
10	8	49.02 \pm 7.24	15,41 \pm 14,20	> 200 \pm 0,00	*
11	9	30.86 \pm 0.54	14,56 \pm 15,08	NE	*
12	10	>200 \pm 0,00	*	NE	*

No.	Código	J774		MDMSP ^a	
		CL ₅₀	ES ^b	CL ₅₀	ES
13	11	>200 ± 0,00	*	NE	*
14	12	>200 ± 0,00	*	NE	*
15	13	>200 ± 0,00	*	NE	*
16	14	>200 ± 0,00	*	>200 ± 0.00	*
17	15	>200 ± 0,00	*	NE	*
Isetionato de pentamidina		7.32 ± 1.51	18,84 ± 10,86	4.66 ± 1.25	5,95 ± 1,54

Los datos de CL₅₀ están expresados en µg/mL. ^aMDMSP: Macrófagos derivados de monocitos sangre periférica. ^bPromedio de los errores estándar calculados para cada CL₅₀, expresado en %. El ES deber ser ≤ 40% de la CL₅₀ y CE₅₀ calculada [71]. ^cNE: No evaluado.*En ausencia de una CL₅₀ el dato de ES no fue calculado.

Con respecto a los ensayos de efectividad sobre promastigotes, solo OmE y los compuestos 1, 4, 6,8, 9, 14, y 15, mostraron una actividad inhibitoria contra *L. panamensis*, mientras que OmE, 6,8 y 9 evidenciaron un efecto antileishmanial también contra *L. braziliensis*, mostrándolos como los más potentes antileishmaniales. Interesantemente el extracto PcE del cual se obtuvieron 8, 9, 14y 15 no mostró actividad leishmanicida contra ninguna de las especies de *Leishmania*, sugiriendo la presencia de antagonistas y/o proporción minoritaria de estas moléculas en el extracto madre (efectos de concentración). Adicionalmente, este resultado soporta la controversia sobre la búsqueda de principios activos bajo el diseño de estudios bioguiados, ya que de ser así, PcE hubiese sido descartado y con él los compuestos 8, 9, 14 y 15. En la Tabla 3-3, se muestran los resultados de los ensayos de efectividad sobre promastigotes de *L. panamensis* y *L. braziliensis*, reportando además el promedio de los errores estándar calculados para cada CE₅₀, que como se expuso en el punto 3.1.7, deben ser alrededor del 40% [71].

Tabla 3-3. Potencial leishmanicida de extractos y compuestos de Lauraceae sobre *L. panamensis* y *L. braziliensis*.

No.	Código	<i>L. panamensis</i>		<i>L. braziliensis</i>	
		CE ₅₀	ES ^a	CE ₅₀	ES ^a
1	OmE	98.03 ± 19.87	27.11 ± 18.23	85.7 ± 22.88	9.45 ± 0.96
2	1	26.65 ± 2.58	23.36 ± 10.54	>100 ± 0.00	*
3	2	>100 ± 0.00	*	>100 ± 0.00	*
4	3	>100 ± 0.00	*	>100 ± 0.00	*
5	4	58.93 ± 32.22	12.90 ± 2.87	>100 ± 0.00	*
6	5	>100 ± 0.00	*	>100 ± 0.00	*
7	6	34.02 ± 14.88	19.49 ± 10.23	36.26 ± 11.41	23.69 ± 12.99
8	7	>100 ± 0.00	*	>100 ± 0.00	*
9	PcE	>50 ± 0.00	*	>200 ± 0.00	*
10	8	19.94 ± 3.31	13.46 ± 0.86	25.04 ± 15.05	18.90 ± 8.15
11	9	25.35 ± 9.21	11.72 ± 9.89	45.39 ± 4.77	16.76 ± 13.43
12	10	>100 ± 0.00	*	>100 ± 0.00	*

No.	Código	<i>L. panamensis</i>		<i>L. braziliensis</i>	
		CE ₅₀	ES ^a	CE ₅₀	ES ^a
13	11	>100 ± 0.00	*	>100 ± 0.00	*
14	12	>100 ± 0.00	*	>100 ± 0.00	*
15	13	>100 ± 0.00	*	>100 ± 0.00	*
16	14	31.11 ± 13.93	18.43 ± 0.40	>100 ± 0.00	*
17	15	58.45 ± 3.34	30.78 ± 13.59	>100 ± 0.00	*
Isetionato de pentamidina		0.46 ± 0.14	5.32 ± 0.40	0.59 ± 0.20	1.92 ± 0.52

Los datos de CE₅₀ están expresados en µg/mL. ^aPromedio de los errores estándar calculados para cada CE₅₀, expresado en %. El ES debe ser ≤ 40% de la CL₅₀ y CE₅₀ calculada [71]. *En ausencia de una CE₅₀ el dato de ES no fue calculado.

Claras tendencias empezaron a observarse en esta parte de la evaluación de la actividad leishmanicida, así los neolignan biciclo[3.2.1]octánicos (2, 3, 12) y benzofuránicos (10, 11), no exhibieron ningún tipo de actividad relevante contra los parásitos e incluso se mostraron inocuas contra las J774 en los ensayos de citotoxicidad. Cabe adicionar que para el compuesto 11 se había encontrado un reporte previo donde se describía con actividad antitriptanosomal [73]. Por otro lado el compuesto 9, un diterpeno de núcleo kaurano, había sido previamente evaluado sobre amastigotes axénicos y promastigotes de *L. braziliensis*, mostrando un efecto más potente sobre los amastigotes [74]. Sin embargo, el ácido kaurenóico (9) no había sido analizado contra *L. panamensis* y en los resultados de estos ensayos, este diterpeno se mostró significativamente ($p=0.0287$) más potente contra *L. panamensis* que para *L. braziliensis*. Sin embargo la citotoxicidad de esta molécula se encontraba en el mismo rango de concentraciones de la CE₅₀ (IS=1) aquí reportadas. Brito y colaboradores reportaron un CL₅₀=25 ± 6.02 µg/mL para el ácido kaurenóico, muy similar a la aquí reportada (CL₅₀=30.86 ± 0.54 µg/mL), no obstante, al comparar la actividad leishmanicida, el ácido kaurenóico se mostró, mucho más activo contra la cepa de promastigotes de *L. braziliensis* utilizada en el reporte de Brito y colaboradores que la cepa de *L. braziliensis* aquí empleada. Estos resultados sugieren que, dicha actividad puede ser extremadamente específica, dependiendo quizá de la especie y cepa de *Leishmania* analizada. Por otro lado, en cuanto a la actividad leishmanicida, una dihidrochalcona, la dihidroflavokavaina B (8), mostró inhibir en un rango de concentraciones similares, promastigotes de *L. panamensis* y *L. braziliensis* con un IS de 2. Este resultado guarda consistencia con otras dihidrochalconas, con estructuras estrechamente relacionadas, que han mostrado efectos leishmanicidas sobre *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani* [75].

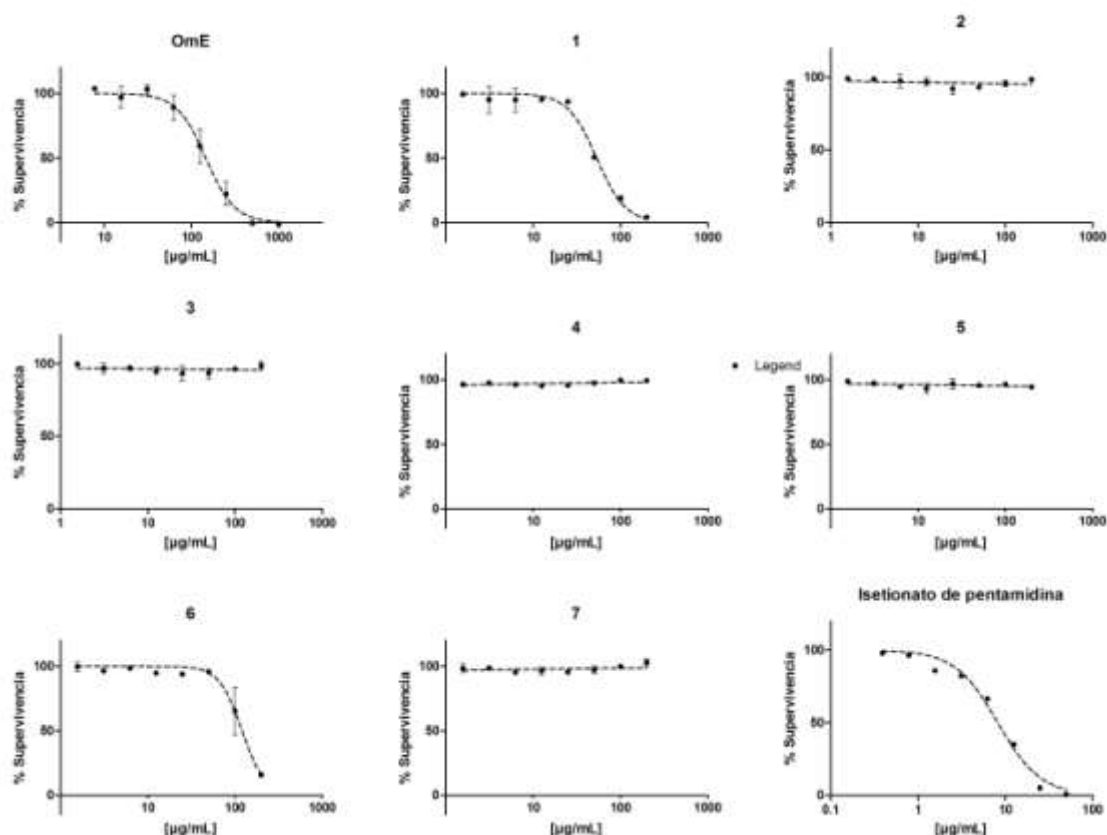


Figura 3-2. Efecto citotóxico de sustancias derivadas de *O. macrophylla* sobre macrófagos murinos J774. Se presentan las curvas concentración-respuesta de un ensayo representativo por duplicado del extracto etanólico de *O. macrophylla* (OmE) y los compuestos 1-7 que se aislaron de éste. Los datos de concentración están expresados en $\mu\text{g/mL}$. El porcentaje de supervivencia, es el resultado de la normalización con respecto al control de células no tratadas. El isetionato de pentamidina fue empleado como medicamento de referencia con actividad leishmanicida.

Si bien el neolignano benzofuránico (4) y los lignanos diarilbutánicos (1) y ariltetralínicos (14 y 15) fueron sólo activos contra *L. panamensis*, se logró describir una relación estructura-actividad. El compuesto 14, (+)otobafenol, exhibió una actividad inhibitoria sobre *L. panamensis* con una CE_{50} igual a $31,1 \mu\text{g/mL}$. Sin embargo, al comparar la actividad de 14 con compuestos evaluados con estructura relacionada (13 y 15), se evidenció que la presencia de una insaturación en el enlace C7-C8 en 15, quizá pueda ser la responsable de la disminución significativa ($p=0.0298$) del potencial antileishmanial, mientras que la doble insaturación en los enlaces C7-C8 y C7'-C8' en 13, estuvo acompañada por la pérdida de actividad, sugiriendo una influencia de la saturación del anillo tetralínico en la actividad. Por otro lado, los lignanos diarilbutánicos diastoméricos (1, 5), también mostraron un comportamiento interesante en términos de la configuración en C-7'. De esta manera, cuando un grupo α -metil se encontraba presente (1), el efecto sobre *L. panamensis* era considerable en comparación con la posición diastomérica del grupo β -metil (5), sin actividad relevante, lo cual sugiere la importancia de la configuración en relación con la actividad inhibitoria y desde luego, con su potencial

antileishmanial para este tipo de lignanos. Finalmente, aunque los dos neolignanos benzofuránicos (4, 6) (un tipo de compuestos con previa actividad antileishmanial reportada [76]), también exhibieron efectos leishmanicidas, el patrón de sustitución del grupo arilo fue encontrado como un factor estructural importante para dicha actividad. De esta manera se pudo evidenciar, que cuando el grupo 3,4-metilenodioxifenil estuvo presente (4), la actividad disminuía, más allá que si se encontraba un grupo 3,4,5-trimetoxifenil como unidad C_6C_3 (6).

Aunque la actividad antileishmanial y el IS calculado para los extractos y compuestos evaluados, fue menor que el control positivo (pentamidina), estos resultados son interesantes ya que revelan posibles condiciones estructurales que podrían relacionarse con la actividad leishmanicida, teniendo en cuenta que los lignanos ariltetralínicos solo fueron activos contra *L. panamensis*. Por otro lado, si bien existen reportes de lignanos asociados con actividad leishmanicida [77, 78], este es el primer reporte de actividad antileishmanial para lignanos diarilbutánicos y diariltetralínicos.

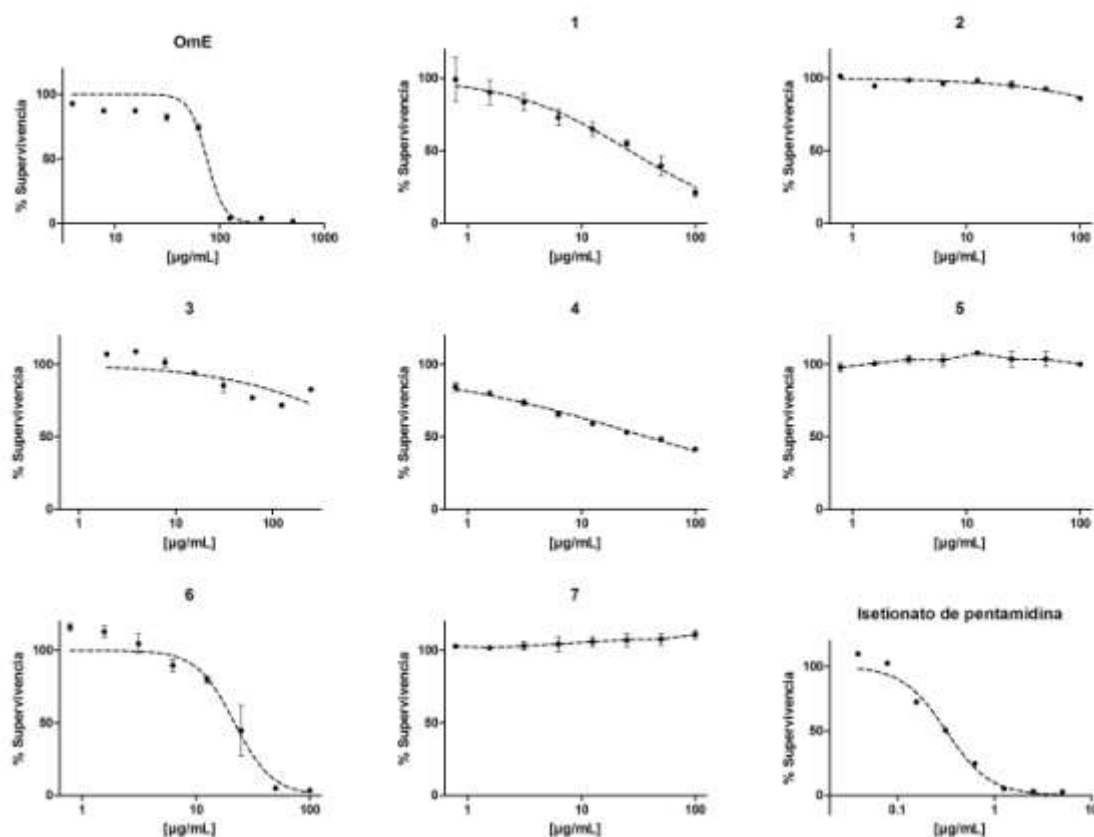


Figura 3-3. Efectividad frente a promastigotes de *L. panamensis* de extractos y/o compuestos derivados de *O. macrophylla*. Se presentan las curvas concentración-respuesta de un ensayo representativo por duplicado del extracto etanólico de *O. macrophylla* (OmE) y los compuestos 1-7 que se aislaron de éste. Los datos de concentración están expresados en $\mu\text{g/mL}$. El porcentaje de supervivencia es el resultado de la normalización con respecto al control de células no tratadas. El isetonato de pentamidina fue empleado como medicamento de referencia con actividad leishmanicida.

Hasta aquí, los resultados sobre el modelo de promastigotes sugerían la posibilidad encontrar un extracto y/o molécula leishmanicida, no obstante, la forma promastigote no es el forma responsable del cuadro clínico de la enfermedad, dado que en el hospedador mamífero la forma asociada con la patología es el amastigote (forma intracelular obligada). Basado en lo anterior, se realizaron ensayos de efectividad sobre MDMSP infectados con *L. panamensis* (véase punto 3.1.4), en dos tiempos diferentes, evaluando de este modo, los dos extractos y 15 compuestos obtenidos de plantas de la familia Lauraceae.

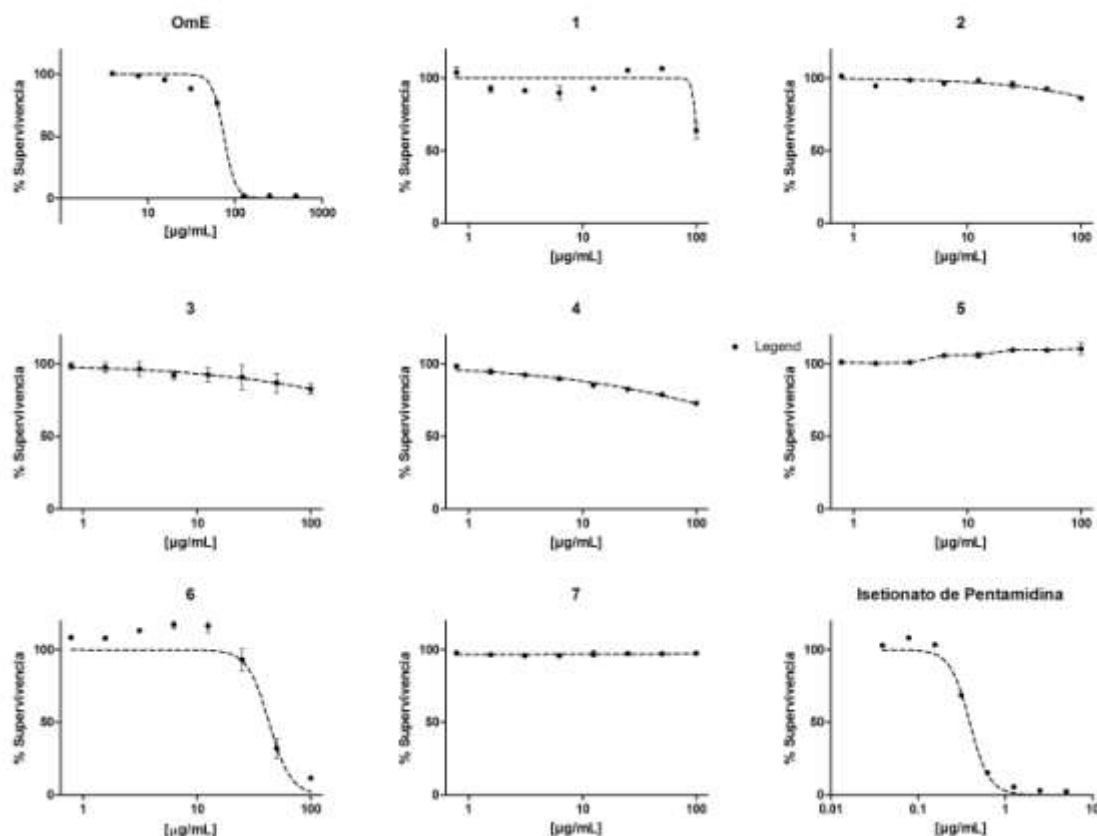


Figura 3-4. Efectividad frente a promastigotes de *L. braziliensis* de extractos y/o compuestos derivados de *O. macrophylla*. Se presentan las curvas concentración-respuestas de un ensayo representativo por duplicado del extracto etanólico de *O. macrophylla* (OmE) y los compuestos 1-7 que se aislaron de éste. Los datos de concentración están expresados en µg/mL. El porcentaje de supervivencia, es el resultado de la normalización con respecto al control de células no tratadas. El isetionato de pentamidina fue empleado como medicamento de referencia con actividad leishmanicida.

En el modelo de amastigotes internalizados, solo el extracto OmE, mostró actividad antileishmanial y fue capaz de reducir por encima de la mitad el porcentaje de células infectadas, con respecto al control negativo (células no tratadas). Por tanto, sólo para este extracto se pudo calcular una CE_{50} igual a 89.08 ± 7.61 (con un ES promedio de 18.32 ± 11.42) y un IS de 3. Comparado con Sb (medicamento de referencia), OmE requirió una ligera menor concentración para evidenciar el mismo efecto, no obstante OmE fue más

citotóxico (véase Tabla 3-4). En la Figura 3-8, se puede observar una curva concentración-respuesta representativa de los ensayos.

De forma llamativa, se encontró una gran similitud al comparar las CE_{50} de OmE obtenidas en los ensayos sobre promastigotes, con la calculada en los ensayos de efectividad sobre formas internalizadas, 98,03 y 89,08 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. No obstante, aunque los compuestos 1, 4 y 6 habían mostrado una moderada actividad contra los promastigotes de *L. panamensis*, no fueron efectivos en los ensayos de células infectadas. Estos resultados permiten sugerir, que estos compuestos no son los únicos responsables de la actividad antileishmanial y que posiblemente en el extracto existan otras moléculas que actuando de manera individual o en asociación con otras (sinergismo o de manera aditiva), puedan explicar el potencial leishmanicida observado para OmE.

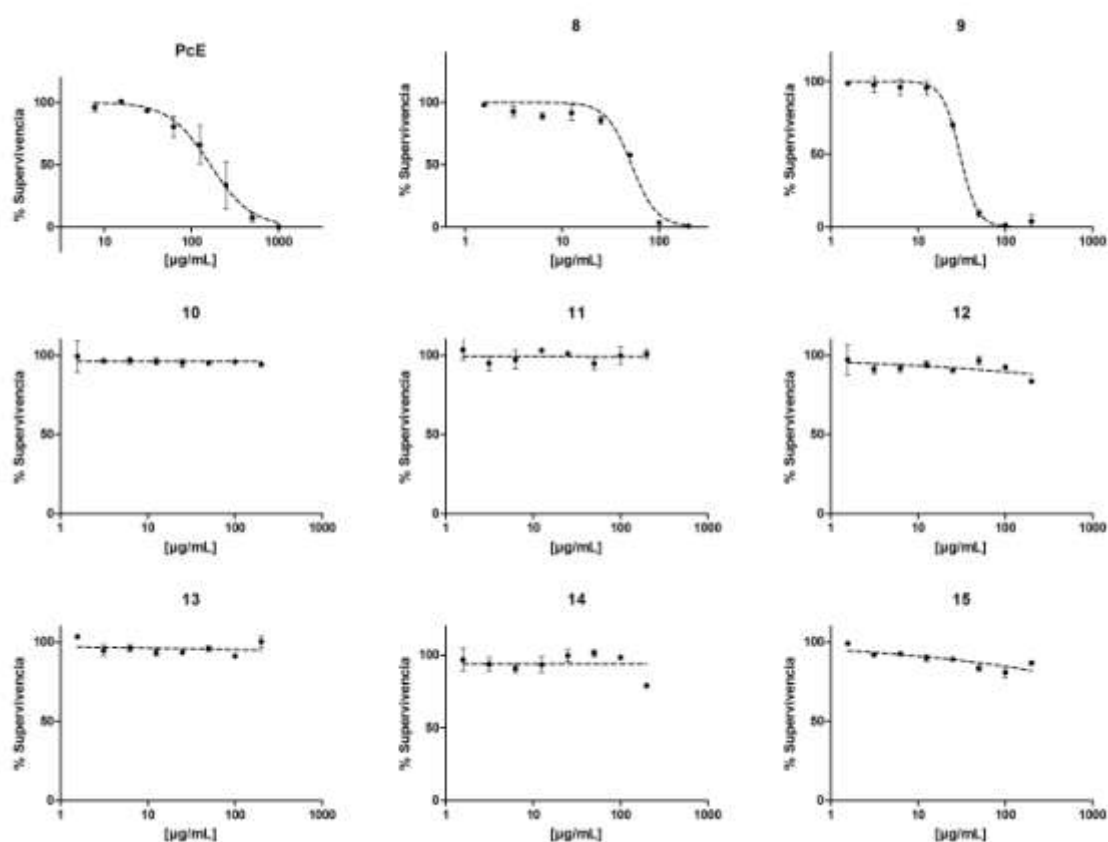


Figura 3-5. Efecto citotóxico de sustancias derivadas de *P. cinereum* contra macrófagos murinos J774. Se presentan las curvas concentración-respuesta de un ensayo representativo por duplicado del extracto etanólico de *P. cinereum* (PcE) y los compuestos 8-15 que se aislaron de éste. Los datos de concentración están expresados en $\mu\text{g/mL}$. El porcentaje de supervivencia, es el resultado de la normalización con respecto al control de células no tratadas.

Tabla 3-4. Extractos de Lauraceae activos contra amastigotes internalizados de *L. panamensis*.

Código	MDMSP ^a			
	CL ₅₀ ^b	CE ₅₀ ^b	ES ^c	IS ^d
OmE	233.75 ± 78.28	89.08 ± 7.61	18,32 ± 11,42	3
Sb	805,7 ± 79,05	180,85 ± 18,03	22,22 ± 1,43	4

^aMDMSP: Macrófagos derivados de monocitos sangre periférica. ^bDatos expresados en µg/mL, ^cPromedio de los errores estándar calculados para cada CL₅₀, expresado en %. El ES deber ser ≤ 40% de la CL₅₀ y CE₅₀ calculada [71]. ^dIS: índice de selectividad.

Otra posibilidad, era que dichos compuestos que sólo se mostraron activos sobre los amastigotes internalizados, lograran dicha actividad bajo las condiciones microambientales (metabólicas, quizá) de la célula hospedera. Por ejemplo, en el caso del ácido kaurenóico (9), Brito y colaboradores mostraron que este diterpeno, era más activo sobre amastigotes, no obstante cuando MDMSP infectados fueron expuesto a éste en nuestros ensayos, no se observó ningún efecto antileishmanial. Por lo anterior, se hace imperativo continuar con una exhaustiva exploración fitoquímica de este extracto y una evaluación biológica más detallada, de sus respectivos compuestos.

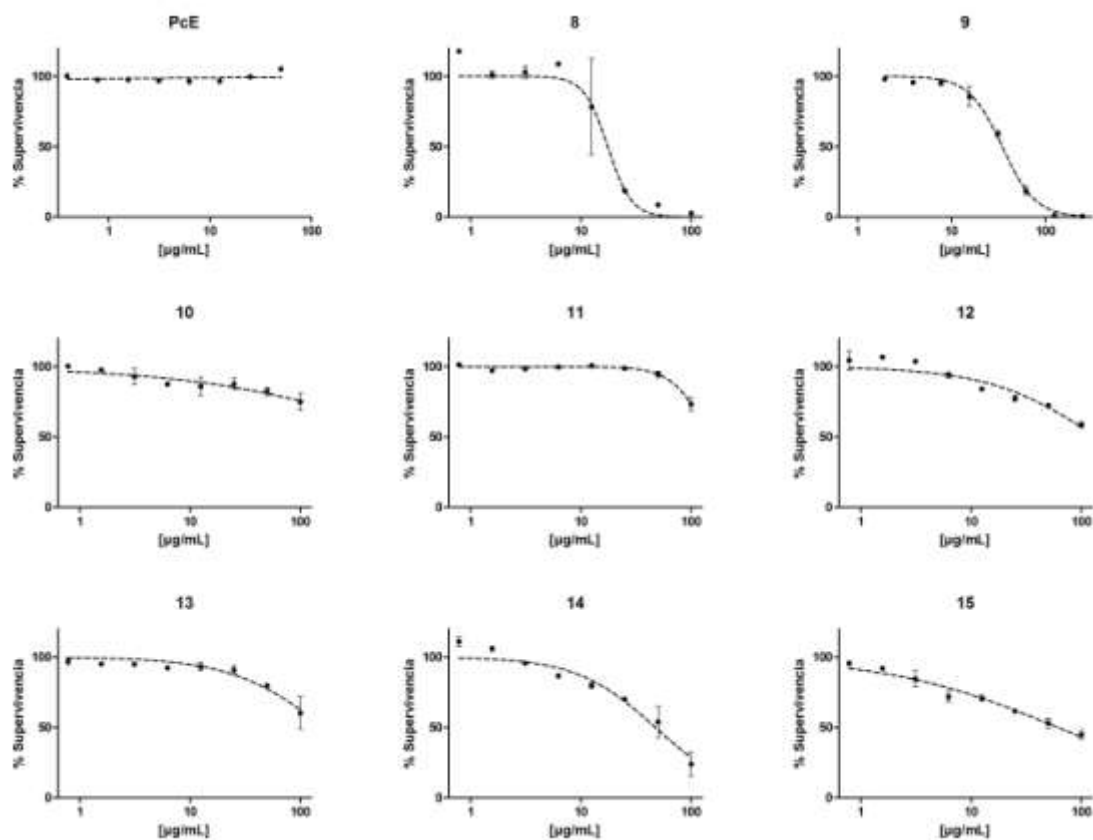


Figura 3-6. Actividad leishmanicida de sustancias derivadas de *P. cinereum* contra promastigotes de *L. panamensis*. Se presentan las curvas concentración-respuesta de un

ensayo representativo por duplicado, para el extracto etanólico de *P. cinereum* (PcE) y los compuestos 8-15 que se aislaron de éste. Los datos de concentración, están expresados en $\mu\text{g/mL}$. El porcentaje de supervivencia es el resultado de la normalización con respecto al control de células no tratadas.

Para el caso del extracto PcE y sus compuestos, no se pudo observar actividad leishmanicida en el modelo de amastigotes internalizados, incluso para el (+)otobafenol (14), que había mostrado la mayor selectividad durante el tamizaje sobre los promastigotes. Resultados como este, soportan la dificultad que se presenta al tratar de deducir el potencial antileishmanial de una molécula o extracto, a partir de sólo evaluaciones sobre promastigotes. No obstante, es importante entender que el modelo de promastigote, es una buena herramienta para intentar vislumbrar mecanismos de acción, ya que una determinada molécula que inhiba ambas formas del parásito, podría sugerir que actúa directamente sobre éste, sin necesidad de descartar otras posibilidades.

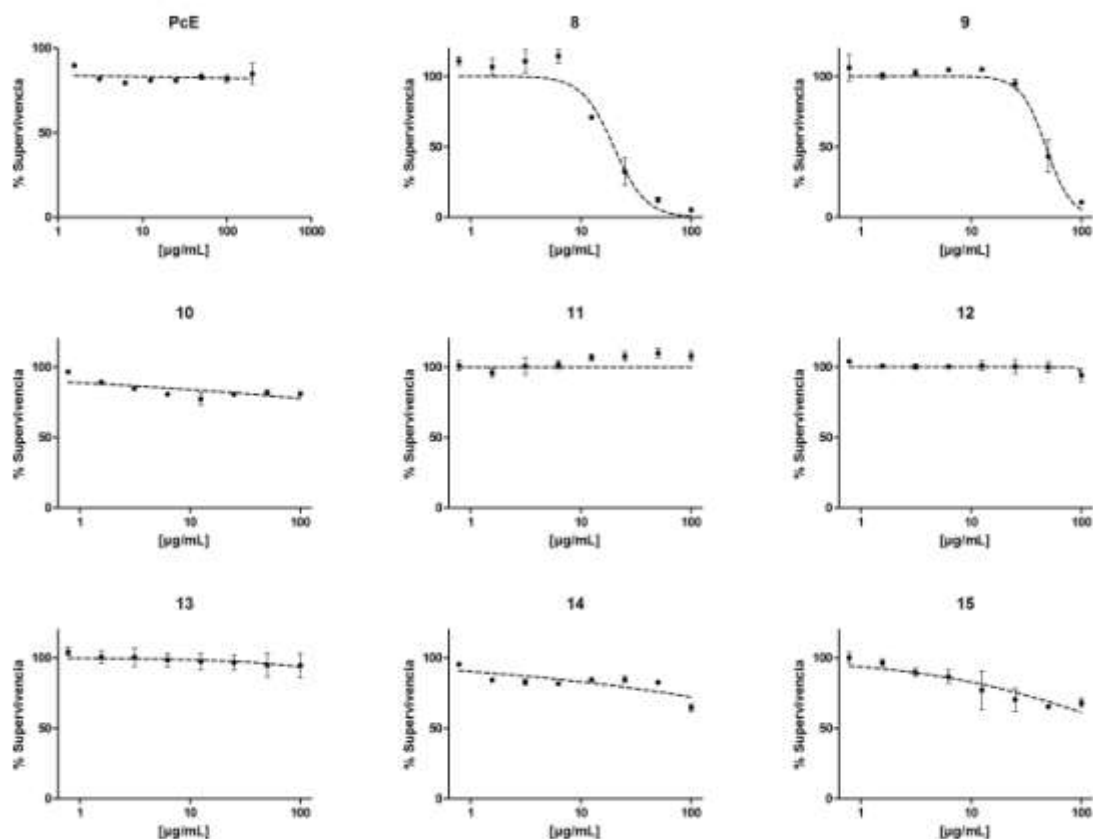


Figura 3-7. Efectividad frente a promastigotes de *L. braziliensis* de extractos y/o compuestos derivados de *P. cinereum*. Se presentan las curvas concentración-respuestas, de un ensayo representativo por duplicado del extracto etanólico de *P. cinereum* (PcE) y los compuestos 8-15 que se aislaron de éste. Los datos de concentración están expresados en $\mu\text{g/mL}$. El porcentaje de supervivencia es el resultado de la normalización con respecto al control de células no tratadas.

Plantas de la familia Lauraceae, han sido reportadas con diversas actividades biológicas y propósitos medicinales [79, 80], incluso antileishmaniales como se expuso en el capítulo uno (véase punto 1.5). Sin embargo, cabe destacar que no existen reportes previos de la evaluación del potencial leishmanicida para *P. cinereum*. Por otra parte, un aceite esencial derivado de hojas de *O. macrophylla*, fue evaluado sobre promastigotes de *L. braziliensis* sin mostrar actividad por debajo de los 500 $\mu\text{g/mL}$ [81], lo cual convierte a OmE en la primera evidencia de actividad antileishmanial relevante para *O. macrophylla*, tanto sobre promastigotes de *L. panamensis* y *L. braziliensis*, como de amastigotes internalizados de *L. panamensis*.

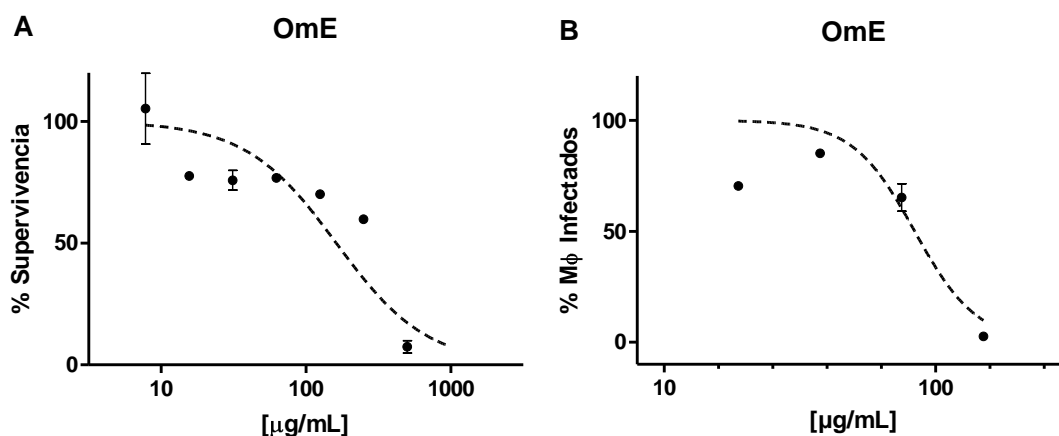


Figura 3-8. Actividad citotóxica y leishmanicida de OmE. A) Citotoxicidad sobre MDMSP. Los MDMSP fueron expuestos por 72 h a OmE. En y, el porcentaje de supervivencia con respecto al control. B) Efecto antileishmanial sobre MDMSP infectados con *L. panamensis*. Los MDMSP fueron expuestos a promastigotes en fase estacionaria, a una proporción de 1:25 durante 24 h y, tratados con OmE por 48 h. Los macrófagos fueron coloreados con SYBR[®] Safe y contados en un microscopio invertido con sistema de fluorescencia. En y, el porcentaje de macrófagos infectados (M Φ) con respecto control (M Φ infectados no tratados).

3.2.2 Actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y compuestos de plantas de la familia Rutaceae

Tanto los ensayos de citotoxicidad, como los de actividad leishmanicida sobre formas libres del parásito, demostraron que los extractos y compuestos de la familia Rutaceae, eran mucho más activos (véase Tabla 3-1), comparados con los de Lauraceae.

En cuanto a la citotoxicidad, cada extracto y compuesto evaluado de la familia Rutaceae, fue activo y permitieron el cálculo de sus respectivas CL_{50} , tanto para macrófagos murinos (J774) como humanos (MDMSP) tal como se aprecia en la Tabla 3-5.

Comparando las CL_{50} calculadas en ambos modelos (J774 y MDMSP), se pudo observar, que no guardaban ningún tipo de semejanza entre ellas, salvo para la berberina (16), la cual mostró un CL_{50} en promedio muy similar entre las reportadas para J774 y MDMSP (véase Tabla 3-5). Gráficas de curvas concentración-respuesta de un ensayo representativo

de cada extracto y compuesto, referente a los ensayos de citotoxicidad sobre J774, es mostrada en las Figuras 3-9.

Tabla 3-5. Citotoxicidad de extractos y compuestos de plantas Rutaceae sobre macrófagos J774 y MDMSP.

No.	No	J774		MDMSP ^a	
		CL ₅₀	ES ^b (%)	CL ₅₀	ES (%)
1	ZmE-1	67.27 ± 19.07	24,39 ± 11,79	139.40 ± 5.23	31,54 ± 1,63
3	ZmE-2	266.17 ± 38.87	14,65 ± 4,64	129.45 ± 28.07	11,61 ± 4,94
4	16	23.53 ± 4.17	25,03 ± 16,31	26.98 ± 0.02	17,68 ± 1,81
5	17	129.69 ± 39.73	31,27 ± 8,80	*	*
6	ZqE-1	60.99 ± 15.68	4,64 ± 1,72	168.85 ± 9.83	27,51 ± 14,63
7	ZqE-2	190.03 ± 22.19	12,44 ± 7,54	*	*
8	ZqE-3	288.17 ± 39.42	12,52 ± 6,84	149.00 ± 14.85	24,79 ± 17,90
9	ZrE	148.03 ± 39.86	12,34 ± 7,14	261.05 ± 83.93	28,16 ± 2,35
Isetionato de pentamidina		7.32 ± 1.51	18,84 ± 10,86	4.66 ± 1.25	5,95 ± 1,54

Los datos de CL₅₀ están expresados en µg/mL. ^aMDMSP: Macrófagos derivados de monocitos sangre periférica. ^bPromedio de los errores estándar calculados para cada CL₅₀, expresado en %. El ES deber ser ≤ 40% de la CL₅₀ y CE₅₀ calculada [71].

Respecto a la actividad leishmanicida, los extractos y compuestos de la familia Rutaceae evaluados en este trabajo, también fueron más activos comparados con los de la familia Lauraceae, a excepción de ZqE-2, el cual no logró inhibir más del 50% la viabilidad de los parásitos en el rango de concentraciones evaluados sobre promastigotes (véase Tabla 3-6 y Figuras 3-10 y 3-11). De esta manera, los dos extractos de *Z. monophyllum* (ZmE-1 y ZmE-2), ZqE-1, ZqE-3, ZrE y la berberina (16), mostraron IS por encima de 2 y aunque el compuesto 17 se mostró activo contra ambas especies de *Leishmania* en los ensayos sobre promastigotes, no fue selectivo y la CE₅₀ de este aldehído aromático, estuvo en el mismo rango de la CL₅₀ aquí reportada (véase Tabla 3-1). En las Figura 3-10 y 3-11 se muestran los resultados de un ensayo representativo de actividad sobre promastigotes de *L. panamensis* y *L. braziliensis*, respectivamente, para cada extracto y compuesto.

Tabla 3-6. Potencial leishmanicida de extractos y compuestos de Rutaceae sobre *L. panamensis* y *L. braziliensis*.

No.	Código	<i>L. panamensis</i>		<i>L. braziliensis</i>	
		CE ₅₀	ES ^b (%)	CE ₅₀	ES ^b (%)
1	ZmE-1	2.58 ± 0.16	7,77 ± 4,90	7.61 ± 0.88	5,85 ± 1,09
2	ZmE-2	25.01 ± 7.45	7,08 ± 1,44	22.89 ± 2.52	6,78 ± 0,02
3	16	0.56 ± 0.16	1,35 ± 0,45	1.83 ± 0.07	1,23 ± 0,17
4	17	135.53 ± 13.29	13,18 ± 0,91	118.17 ± 11.27	9,22 ± 1,53
5	ZqE-1	0.52 ± 0.21	1,80 ± 1,13	2.02 ± 0.14	1,78 ± 0,56
6	ZqE-2	>500 ± 0,00	*	>500 ± 0,00	*

No.	Código	<i>L. panamensis</i>		<i>L. braziliensis</i>	
		CE ₅₀	ES ^b (%)	CE ₅₀	ES ^b (%)
7	ZqE-3	23.73 ± 8.66	12,99 ± 2,28	123.13 ± 26.14	23,42 ± 2,52
8	ZrE	17.17 ± 0.56	8,55 ± 0,03	34.57 ± 20.68	16,09 ± 7,72
Isetionato de pentamidina		0.46 ± 0.14	5,32 ± 0,40	0,59 ± 0,20	1,92 ± 0,52

Los datos de CE₅₀ están expresados en µg/mL. ^aPromedio de los errores estándar calculados para cada CE₅₀, expresado en %. El ES deber ser ≤ 40% de la CL₅₀ y de la CE₅₀ calculada [71]. *En ausencia de una CE₅₀ el dato de ES no fue calculado.

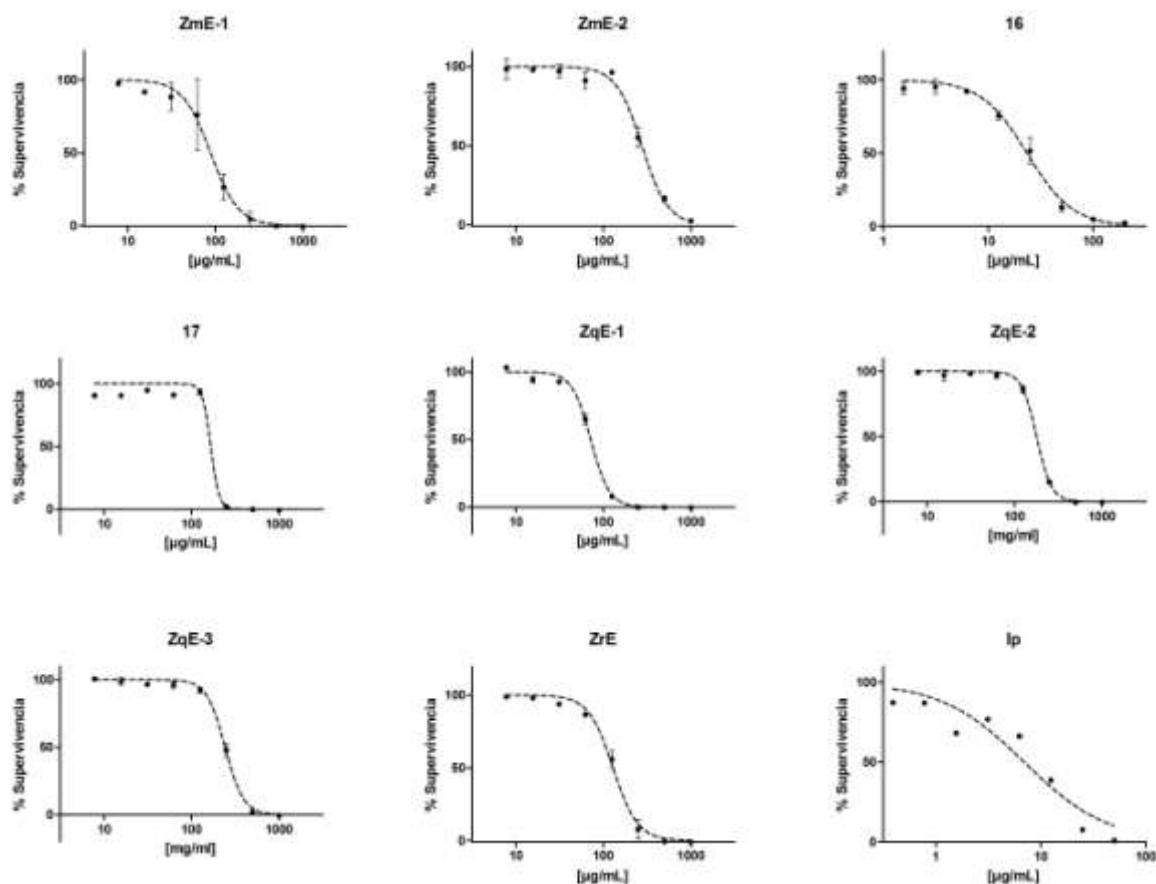


Figura 3-9. Efecto citotóxico de sustancias derivadas de plantas de la familia Rutaceae contra macrófagos murinos J774. Se presentan las curvas dosis-respuestas de un ensayo representativo por duplicado de los extracto etanólicos de *Z. monophyllum* (ZmE-1 a -3) *Z. quinduense* (ZqE-1 a -3) y *Z. rhoifolium* (ZrE) y los compuestos 16-17. Los datos de concentración, están expresados en µg/mL. El porcentaje de supervivencia es el resultado de la normalización con respecto al control de células no tratadas.

Cuando la evaluación de la actividad leishmanicida se realizó sobre el modelo de MDMSP infectados, el extracto ZmE-1 y el compuesto 16 (berberina) fueron los únicos capaces de reducir por encima del 50% el porcentaje de células infectadas con respecto al control negativo (células infectadas no tratadas), con una CE₅₀ de 35,39 ± 1,99 y 7.32 ± 7.28,

respectivamente (véase Tabla 3-7). Una gráfica de un ensayo representativo para ZmE-1 y 16, es presentada en las Figura 3-12.

Tabla 3-7. Actividad leishmanicida de extractos y compuestos de Rutaceae contra amastigotes internalizados de *L. panamensis*.

Código	MDMSP ^a			
	CL ₅₀ ^b	CE ₅₀ ^b	ES ^c	IS ^d
ZmE-1	139.40 ± 5.23	35.39 ± 1.99	24,00 ± 12,03	4
16	26.98 ± 0.02	7.32 ± 7.28	3,46 ± 2,64	4
Sb	805,7 ± 79,05	180,85 ± 18,03	22,22 ± 1,43	4

^aMDMSP: Macrófagos derivados de monocitos sangre periférica. ^bDatos expresados en µg/mL, ^cPromedio de los errores estándar calculados para cada CL₅₀, expresado en %. El ES deber ser ≤ 40% de la CL₅₀ y de la CE₅₀ calculada [71]. ^dIS: índice de selectividad.

Sorprendentemente, la CE₅₀ que se calculó para el Sb (medicamento de referencia), fue considerablemente mayor a la que usualmente se reporta, que está entre los 10 y 25 µg/mL [82, 83], sugiriendo una menor susceptibilidad de la cepa de *L. panamensis* aquí utilizada, y resalta por ende, la actividad leishmanicida encontrada para ZmE-1 y OmE, ya que ambas requirieron significativamente menores concentraciones para mostrar el mismo efecto.

Los resultados mostrados por los extractos y compuestos de Rutáceas, revalidan lo discutido anteriormente acerca de la dificultad al momento de extrapolar los resultados obtenidos en los ensayos sobre promastigotes, en este caso, sólo cerca del 25% de los potenciales leishmanicidas sugeridos por los ensayos sobre promastigotes, fueron efectivos contra *L. panamensis* en el modelo de amastigotes internalizados. Incluso, el extracto ZqE-1, el más activo y selectivo contra ambas especies de *Leishmania* en los ensayos sobre promastigotes, no fue efectivo contra los amastigotes internalizados. Múltiples razones pueden explicar las diferencias encontradas a este nivel, ya que si bien entre la forma promastigote y amastigote, más del 94% de sus genes son expresados en ambos estadios celulares, existe un pequeño grupo de genes que son restringidos para cada una de las formas [84]. Adicionalmente diversos estudios han demostrado que existen diferencias en el metabolismo de amastigotes y promastigotes [85, 86]. Otra posibilidad tentativamente asociada, es el metabolismo que pueden los extractos o compuestos, al interior de la célula hospedadora, ya que cuando una molécula o un grupo de ellas (como es el caso de los extractos) se expone a células infectadas, antes de su encuentro con el amastigote (si se da el caso), los compuestos que logren ingresar a la célula hospedadora, eventualmente pueden ser metabolizados y estos metabolitos resultantes, ser más o menos activos contra el parásito.

En una eventual actividad leishmanicida, existe la posibilidad que ésta se deba a una acción directa sobre el parásito o que el efecto antileishmanial sea ejercido por una acción indirecta, a través de la activación de la célula hospedadora, en este caso el macrófago. Por esta razón, en el capítulo de inmunomodulación se aborda esta posibilidad a través de la cuantificación de citoquinas y la producción de NO, por parte de los macrófagos (uno

de los principales mecanismos de depuración de microorganismos que han sido fagocitados).

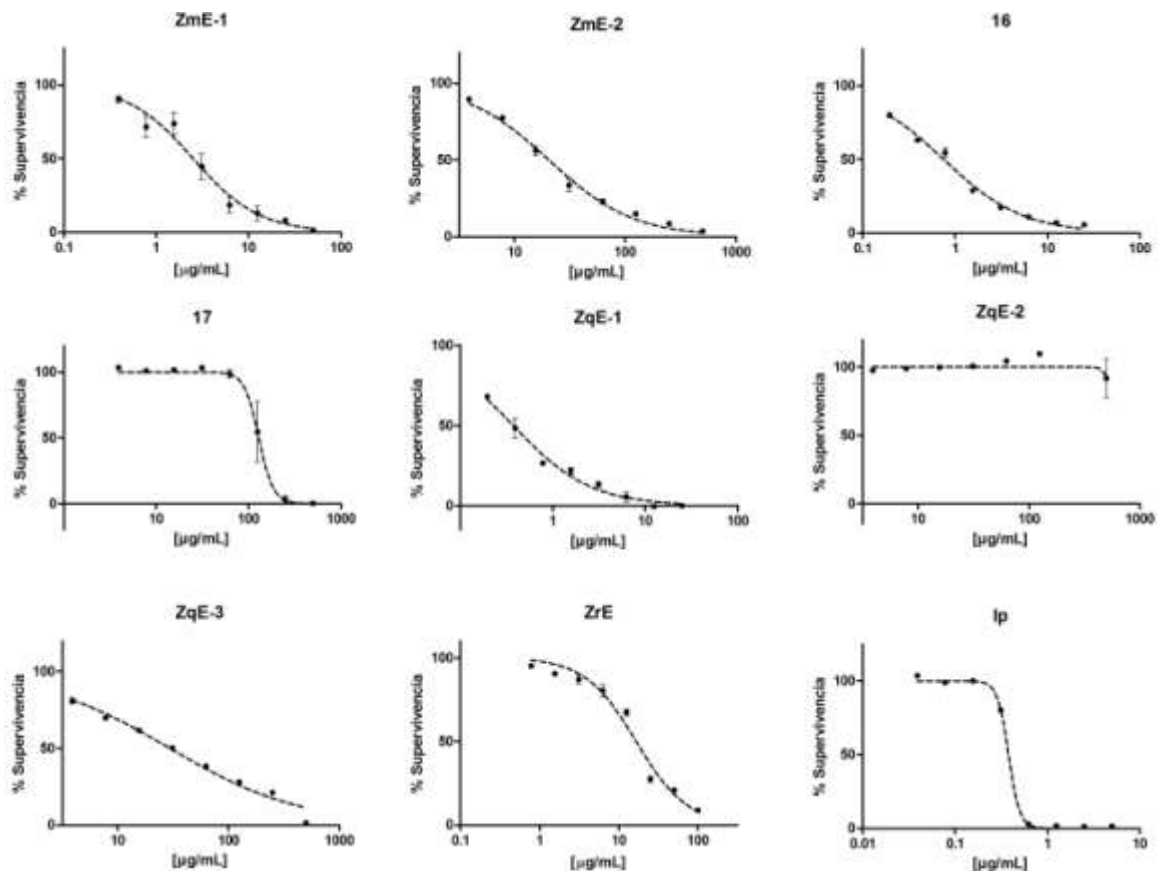


Figura 3-10. Actividad leishmanicida de sustancias derivadas de plantas de la familia Rutaceae contra promastigotes de *L. panamensis*. Se presentan las curvas dosis-respuestas de un ensayo representativo por duplicado de los extracto etanólicos de *Z. monophyllum* (ZmE-1 a -3), *Z. quinduense* (ZqE-1 a -3) y *Z. rhoifolium* (ZrE) y los compuestos 16-17. Los datos de concentración están expresados en µg/mL. El porcentaje de supervivencia, es el resultado de la normalización con respecto al control de células no tratadas.

La berberina (16), aislada de ZmE-1 (véase punto 2.2), es un alcaloide cuya actividad leishmanicida, ha sido reportada desde hace algún tiempo[13] incluso, compuestos relacionados y algunos análogos, han mostrado relevantes efectos antileishmaniales contra *L. panamensis* y *L. donovani*, en modelos *in vivo* [87]. En los modelos implementados en este trabajo, la berberina, mostró una actividad leishmanicida *in vitro* contra *L. panamensis*, tanto para las formas promastigotes ($CE_{50} = 0.56 \pm 0.16$) como para formas internalizadas ($CE_{50} = 7.32 \pm 7.28$). La variabilidad que mostró la CE_{50} de la berberina durante los ensayos de efectividad sobre amastigotes internalizados, puede quizá, asociarse a la influencia que tiene el genotipo de cada individuo en la resistencia o susceptibilidad a la infección (hay que recordar que en el modelo con macrófagos humanos, se emplearon muestras de donantes sanos, con la variabilidad propia de la especie), no obstante, el error estándar para la CE_{50} en promedio fue de 3.46 ± 2.64 , lo cual hace muy confiable los datos que se hallaron. A la berberina se le ha descrito su capacidad de interactuar con

ácidos nucleicos y bloquear la síntesis de macromoléculas [88, 89], lo cual se asocia a su gran poder inhibitorio.

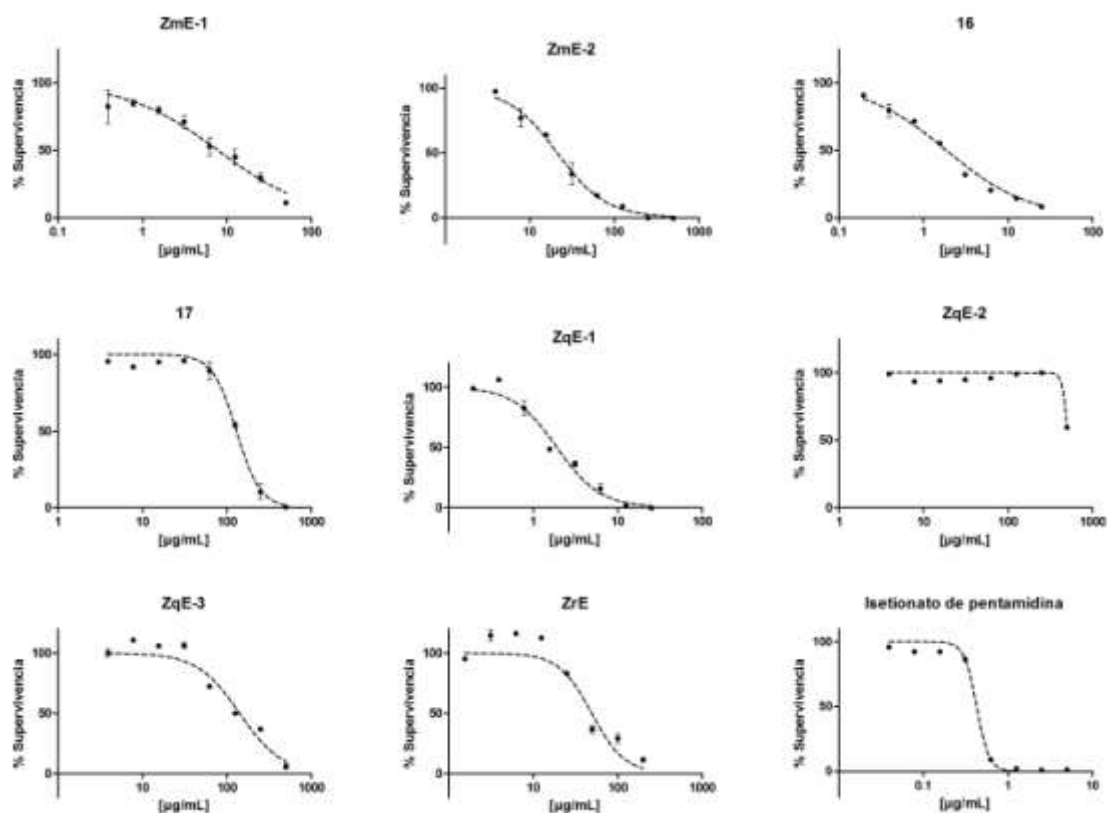


Figura 3-11. Actividad leishmanicida de sustancias derivadas de plantas de la familia Rutaceae contra promastigotes de *L. braziliensis*. Se presentan las curvas concentración-respuesta, de un ensayo representativo por duplicado de los extracto etanólicos de *Z. monophyllum* (ZmE-1 y ZmE-3) *Z. quinduense* (ZqE-1 a ZqE-3) y *Z. rhoifolium* (ZrE) y los compuestos 16-17. Los datos de concentración están expresados en µg/mL. El porcentaje de supervivencia, es el resultado de la normalización con respecto al control de células no tratadas.

Teniendo en cuenta que berberina fue aislado de ZmE-1, existe la probabilidad que el poder antileishmanial encontrado para éste último se debiera a la acción de berberina, sin embargo, es importante tener en cuenta el contenido de berberina en el extracto es solo del 0,077 %, por tal razón es factible que: (i) existan más compuestos que contribuyan a la actividad leishmanicida de este extracto, ya que a la CE_{50} que se calculó para ZmE-1 la participación de berberina no explicaría este efecto, ó (ii) la potencia de la berberina sea lo suficientemente significativa al asociarse con otras moléculas, para que a estas bajas concentraciones se observe este efecto relevante. Con estos resultados, se apoya la continuidad que se debe seguir en la exploración fitoquímica y sus correspondientes evaluaciones, en cuanto a actividad antileishmanial, de ZmE-1, en la búsqueda de novedosos principios activos contra *Leishmania spp.*

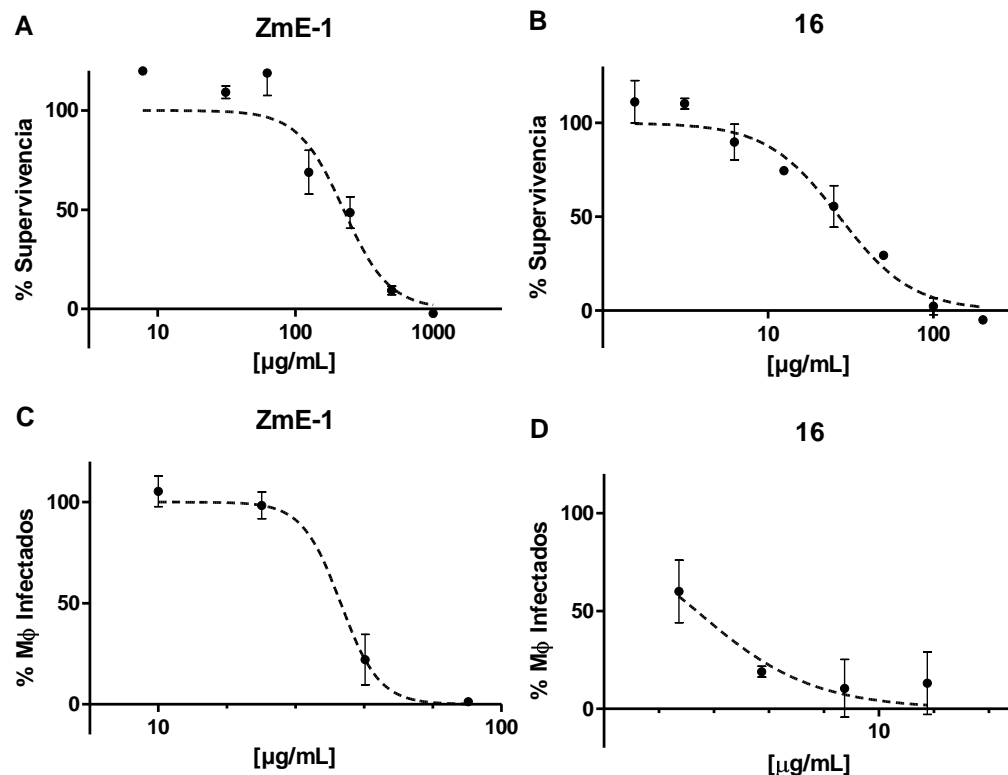


Figura 3-12. Actividad citotóxica y leishmanicida de ZmE-1 y 16 sobre MDMSP infectados con *L. panamensis*. Los MDMSP fueron expuestos a promastigotes en fase estacionaria a una proporción de 1:25 durante 24 h y tratados con ZmE-1 y 16 por 48 h. Los macrófagos fueron coloreados con SYBR® Safe y, contados en un microscopio invertido con sistema de fluorescencia. En el eje y, el porcentaje de macrófagos infectados se encuentra normalizado con respecto al control (células infectadas sin tratamiento).

A diferencia de los géneros *Ocotea* y *Pleurothyrium*, el género *Zanthoxylum* ha sido más explorado en cuanto a sus propiedades biológicas, incluido su potencial leishmanicida como se expuso en el capítulo uno (véase sección 1.5), convirtiéndolo en un género de considerable interés. Diferentes especies del género *Zanthoxylum* (distintas a las aquí evaluadas), han sido asociadas con actividad antifúngica y antibacteriana [90, 91]. También *Z. minutiflorum* y otras 8 especies de Rutaceae, han mostrado en ensayos *in vitro* actividad inhibitoria sobre *Trypanosoma cruzi* [92]. Por su parte *Z. monophyllum* y *Z. rhoifolium*, han sido relacionadas con actividad antibacteriana [57, 93-95]. Un ensayo bioguiado permitió validar el uso como antimalárico de *Z. rhoifolium*, y permitió identificar un compuesto con actividad inhibitoria sobre *Plasmodium falciparum* [96]. No obstante, para *Z. monophyllum* y *Z. rhoifolium*, junto con *Z. quinduense* (que no posee reportes previos de ninguna actividad biológica), los datos aquí presentados son la primera evidencia experimental de actividad antileishmanial, lo que adicionalmente revalida el potencial interés farmacéutico del género *Zanthoxylum* para Colombia.

4 Inmunomodulación

Como se expuso en el capítulo 1 en la sección 1.6, se ha establecido que el papel del sistema inmune en el desarrollo de la leishmaniosis es crucial, y que existen individuos capaces de controlar la infección de manera natural. Adicional a esto, se ha encontrado que en individuos con LC que responden favorablemente a un tratamiento con estibogluconato de sodio (Sb), decrecen los niveles de expresión de IL-13 (citoquina de un perfil Th2), contrario a lo que se observa en los individuos que no responden favorablemente al tratamiento [12], incluso se ha visto que estos individuos con LC en los que falla el tratamiento, se caracterizan por la producción de IL-10 en sus macrófagos y células T [12]. Este resultado es consistente, si se tiene en cuenta que la IL-10 tiene efectos inhibitorios sobre IL-12 [97] e IFN- γ [98], y que la efectividad del Sb se reduce marcadamente en ratones C57BL/6 “*knock-out*” para el gen del IFN- γ . Inclusive se ha observado que pacientes con LV, a quienes se les administró Sb conjuntamente con IFN- γ recombinante, responden más rápido al tratamiento, que los individuos tratado únicamente con Sb [99]. Un estudio que involucró pacientes infectados con *L. peruviana* que no respondían al tratamiento con antimonio de meglumina, y que fueron sometidos a una terapia de este antimonio pentavalente combinada con imiquimod (un medicamento inmunomodulador), reportó que el 90% de ellos resolvieron la infección después de 6 meses [100]. La anterior evidencia permite sugerir, que en la búsqueda de un agente antileishmanial, su potencial actividad inmunomoduladora sería una característica importante que concedería ventajas, si dicha actividad potenciará y/o activará la producción de mediadores solubles, tales como citoquinas y quemoquinas, que en el contexto de la enfermedad se asocian con protección. En este sentido, en el modelo de J774 se evaluaron las citoquinas IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α y la quemoquina CCL-2, también conocida como MCP-1 (Cat. No. 552364, Becton Dickinson, San José, CA, USA). Por su parte en el modelo de MDMSF, se cuantificaron las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α y la quemoquina CXCL8, también conocida como IL-8 (Cat. No. 551811, Becton Dickinson, San José, CA, USA).

Los parásitos de *Leishmania spp.*, se internalizan y replican principalmente en macrófagos [1], no obstante los macrófagos son células altamente eficientes en la eliminación de microorganismos, función que llevan a cabo principalmente por el estallido oxidativo, que resulta de la producción de intermediarios de oxígeno reactivos (IOR) e intermediarios de nitrógeno reactivos (INR) [101]. Sin embargo, se sabe que *Leishmania spp.*, paraliza los macrófagos y favorece su replicación en su interior (en aquellos susceptibles). Los resultados de un estudio realizado en ratones C57BL/6 infectados experimentalmente con *L. donovani*, permiten sugerir que la producción de INR es determinante en la eliminación de parásitos de *Leishmania* comparado con los IOR [102]. En este orden de ideas, también se consideró importante evaluar si el tratamiento con alguno de los compuestos o los extractos afectaba la producción de INR, lo cual se llevó a cabo mediante la cuantificación de óxido nítrico (NO), indirectamente a través del sistema de reactivos de Griess [103].

A continuación se describe en detalle los procedimientos y herramientas que se emplearon, con el fin de evaluar el eventual efecto inmunomodulador que resultará de la exposición a

los extractos y/o compuestos sobre los macrófagos murinos (J774) y los macrófagos humanos (MDMSP).

4.1 Metodología

De acuerdo a los resultados mostrados en el capítulo 3, los extractos OmE, ZmE-1 y el compuesto 16, mantuvieron su condición antileishmanial y fueron activos contra formas internalizadas de *Leishmania*. Adicionalmente, los compuestos 6, 8, 14 y los extractos ZmE-2, ZqE-1, ZqE-3 y ZrE que en el modelo de promastigotes exhibieron propiedades leishmanicidas con IS mayor o igual a 2, fueron evaluados en cuanto a su efecto inmunomodulador.

Para el caso de los macrófagos J774, recordando que durante la fase experimental no fue posible encontrar porcentajes de parasitosis fiables, que validaran su uso como modelo, el efecto inmunomodulador fue evaluado únicamente sobre células no infectadas expuestas a los tratamientos. Para los MDMSP, la evaluación fue practicada tanto en células infectadas como en no infectadas.

Las citoquinas, quemoquinas y los nitritos, como indicadores de inmunomodulación, fueron cuantificados en sobrenadantes de cultivo de macrófagos (murinos y humanos), de los correspondientes ensayos (citotoxicidad o de actividad leishmanicida sobre amastigotes internalizados), criopresevados a -20°C hasta el momento de su utilización.

4.1.1 Cuantificación de mediadores solubles

La producción de citoquinas y/o quemoquinas se estableció, usando un sistema de *Cytometric Bead Array* (CBA) empleando los sobrenadantes recolectados de los ensayos de citotoxicidad y efectividad sobre amastigotes, descritos en 3.1.3 y 3.1.5, respectivamente. Esta técnica provee una alta sensibilidad, capaz de detectar citoquinas secretadas aún a bajas concentraciones y expresadas bajo condiciones patogénicas [104].

Para cada extracto o compuesto, 3 sobrenadantes que corresponden a 3 diferentes concentraciones fueron analizados. Para el caso de los macrófagos J774, corresponden a la mayor concentración, una concentración cercana a la CL_{50} y la menor concentración; mientras que para los MDMSP, los sobrenadantes seleccionados corresponden a las concentraciones más altas, más bajas y la cercana a la CE_{50} , de los ensayos de actividad leishmanicida sobre amastigotes internalizados.

El procedimiento fue seguido de acuerdo a la recomendaciones del fabricante, brevemente, 50 μ L de cada muestra fueron mezcladas con 50 μ L de la mezcla de las perlas de captura (una mezcla que contiene perlas específicas para cada una de las citoquinas y quemoquinas a evaluar) y 50 μ L de los anticuerpos de detección (también específico para cada una de la proteína y conjugado con ficoeritrina). Luego se incubaron por 2 horas en el caso de los sobrenadantes que procedían de ensayos con J774, y 3 horas para los ensayos con MDMSP, a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

Paralelo a esto, diluciones de proteínas recombinantes para cada citoquina fueron montadas para crear la curva patrón, para cada kit.

Finalmente, se procedió a la adquisición de datos de cada muestra, en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Bioscience, USA). Los resultados fueron analizados en el software FCAP Array™ v2.0 (Soft Flow Inc., USA), para la extrapolación de las intensidades medias de fluorescencia en pg/mL, según la curva patrón construida para cada mediador.

Las citoquinas a evaluar se seleccionaron apoyadas en la revisión de literatura y representan las relevantes para los efectos inmunomoduladores que se pretenden estimar. Los mediadores solubles evaluados en sobrenadantes de macrófagos murinos fueron IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , y MCP-1, mientras que los solubles evaluados en humanos fueron IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α y IL-8. Las diferencias en el tipo de mediadores cuantificados, radican en la disponibilidad de reactivos (kits analíticos comerciales).

4.1.2 Cuantificación de óxido nítrico

Una forma de evaluar la formación de óxido nítrico (NO), es a través del cálculo de nitritos (NO₂⁻), uno de los primeros y estables productos de NO, el cual, como se mencionó al inicio de este capítulo se puede hacer a través del sistema de reactivos de Griess [103].

La detección de este analito, se basa en una reacción que usa sulfanilamida al 1% en 5% ácido fosfórico y 0,1% de diclorhidrato de N-1-naftiletilendiamina (NED, por sus siglas en inglés). Este sistema detecta NO₂⁻ en una gran variedad de matrices líquidas biológicas y experimentales.

Como control positivo de producción de NO, células J774 fueron estimuladas con concentraciones seriadas (50, 25 y 12,5 μ g/mL) de lipopolisacárido (LPS), un reconocido inductor bacteriano de NO [105].

En resumen, a 50 μ L de una alícuota distinta de los mismos sobrenadantes que fueron utilizados para correr el CBA, se les adicionó 50 μ L de sulfanilamida y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Pasado este tiempo, se agregaron 50 μ L de la solución NED y se dejó incubar nuevamente por 10 a 20 minutos antes de su lectura a por absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro Ultramark™ Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, USA).

La cuantificación se realizó utilizando una curva de calibración preparada a partir de concentraciones conocidas de nitrito de sodio.

Para determinar si existe una relación lineal entre la sustancia evaluada (extractos y/o compuestos) y la producción de nitritos (como medida indirecta de la producción de NO), los valores calculados de los ensayos se graficaron bajo un modelo de regresión lineal a través de GraphPad Prism versión 5.00 (GraphPad Software, USA), para establecer un coeficiente de determinación (r^2) y así el grado de correspondencia de las variables.

4.2 Resultados y Discusión

Para facilitar la exposición y análisis de resultados, estos serán divididos en dos secciones, la primera donde se mostrarán los correspondientes al modelo sobre J774 y el segundo, los obtenidos en los ensayos de citotoxicidad y actividad leishmanicida sobre amastigotes utilizando el modelo de MDMSP.

4.2.1 Inmunomodulación sobre macrófagos murinos J774

Los resultados de los ensayos sobre J774 mostraron que este linaje celular posee una producción basal de IL-6, CCL-2, TNF y NO (medida indirectamente a través de la concentración de nitritos) como se puede observar en la Tabla 4-1 y en las Figuras 4-1 y 4-2.

Tabla 4-1. Cuantificación de citoquinas y NO por macrófagos J774 expuestos a extractos y compuestos de Lauraceae y Rutaceae.

	IL-6 ^a	CCL-2 ^a	TNF ^a	NO ^b
Células Solas ^c	126,67 ± 83,85	4005,87 ± 1242,92	218,83 ± 11,37	9,89 ± 4,03
OmE + ^e	NR ^h	NR	NR	6,47 ± 5,41
OmE ₅₀ ^f	NR	NR	NR	2,64 ± 1,61
OmE - ^g	90,84 ± 33,41	4122,79 ± 31,52	243,36 ± 68,87	18,03 ± 0,35
6 +	96,74 ± 71,45	2296,43 ± 730,2	87,6 ± 11,99	3,94 ± 3,45
6 ₅₀	100,55 ± 70,55	3304,11 ± 1340,07	194,54 ± 58,85	2,32 ± 2,07
6 -	134,59 ± 68,65	3958,71 ± 700,35	219,07 ± 32,93	16,32 ± 6,68
8 +	30,67 ± 6,56	1264,62 ± 91,87	14,27 ± 20,18	13,55 ± 1,84
8 ₅₀	143,96 ± 39,46	3028,25 ± 656,23	38,05 ± 9,35	8,1 ± 1,96
8 -	58,09 ± 69,88	2731,54 ± 3176,74	48,82 ± 69,03	9,48 ± 1,61
14 +	102,77 ± 81,23	3039,54 ± 1707,22	41,4 ± 15,66	13,96 ± 0,58
14 ₅₀	195,17 ± 175,28	3543,43 ± 1696,45	64,98 ± 30,87	11,84 ± 2,65
14 -	175,52 ± 198,25	3962,45 ± 1265,91	61,57 ± 10,25	21,53 ± 2,3
ZmE-1 +	3,09 ± 4,36	762,85 ± 480,85	8,92 ± 12,61	19,9 ± 0,46
ZmE-1 ₅₀	49,53 ± 35,5	2697,4 ± 2104,36	82,2 ± 87,58	8,1 ± 6,79
ZmE-1 -	16,06 ± 12,16	3169,78 ± 1522,74	42,38 ± 28,36	33,66 ± 13,93
ZmE-2 +	49,58 ± 57,25	624,4 ± 495,48	22,59 ± 31,94	24,54 ± 1,5
ZmE-2 ₅₀	27,23 ± 23,04	1038,36 ± 565,41	36,52 ± 51,65	5,73 ± 7,37
ZmE-2 -	101,11 ± 108,85	3704,29 ± 1737,38	111,44 ± 103,6	33,58 ± 3,91
16 +	79,63 ± 106,94	889,19 ± 591,12	48,28 ± 68,27	27,39 ± 19,11
16 ₅₀	157,15 ± 51,97	3037,01 ± 1119,65	116,37 ± 47,43	24,87 ± 27,75
16 -	81,34 ± 71,42	3623,19 ± 1211,95	62,38 ± 24,88	33,98 ± 15,31
ZqE-1 +	0,00	0,00	0,00	19,41 ± 5,3
ZqE-1 ₅₀	15,44 ± 4,3	1966,84 ± 856,45	31,01 ± 16,09	6,55 ± 0,23
ZqE-1 -	32,43 ± 27,97	3422,87 ± 1664,93	88,97 ± 89,77	48,96 ± 38,34
ZqE-3 +	4,82	92,45	0,00	35,61 ± 1,5

	IL-6 ^a	CCL-2 ^a	TNF ^a	NO ^b
ZqE-3 ₅₀	23,13 ± 14,91	742,47 ± 515,81	14,52 ± 20,53	6,39 ± 6,22
ZqE-3 -	64,92 ± 39,94	3454,58 ± 1260,09	76,13 ± 30,41	44,08 ± 0,35
ZrE +	11,91 ± 4,56	915,645 ± 26,92	6,42 ± 9,07	29,83 ± 16,12
ZrE ₅₀	177,98	2391,57	48,71	6,55 ± 2,3
ZrE -	59,96 ± 59,01	2852,25 ± 766,35	49,75 ± 20,32	39,19 ± 8,17
Pentamidina +	32,82 ± 46,41	819,04 ± 354,67	27,53 ± 38,93	33,01 ± 28,21
Pentamidina ₅₀	129,61 ± 183,3	2408,06 ± 3352,18	95,4 ± 134,92	7,93 ± 2,42
Pentaminida -	139,43 ± 163,72	3191,7 ± 1529,19	127,21 ± 116,96	37,48 ± 7,83

^aDatos expresados en pg/mL. ^bDatos expresados en µM. ^cCélulas no expuestas a ningún tratamiento, representa la producción basal. ^dDesviación estándar. ^eEl signo + representa la mayor concentración evaluada para cada extracto o compuesto. ^fEl número ₅₀ representa la concentración más cercana a la CL₅₀ calculada para determinado extracto o compuesto. ^gEl signo - representa la menor concentración que fue utilizada en el ensayo de citotoxicidad para un extracto o compuesto dado. ^hNR: Dato no reportado por el equipo, niveles indetectables de la citoquina.

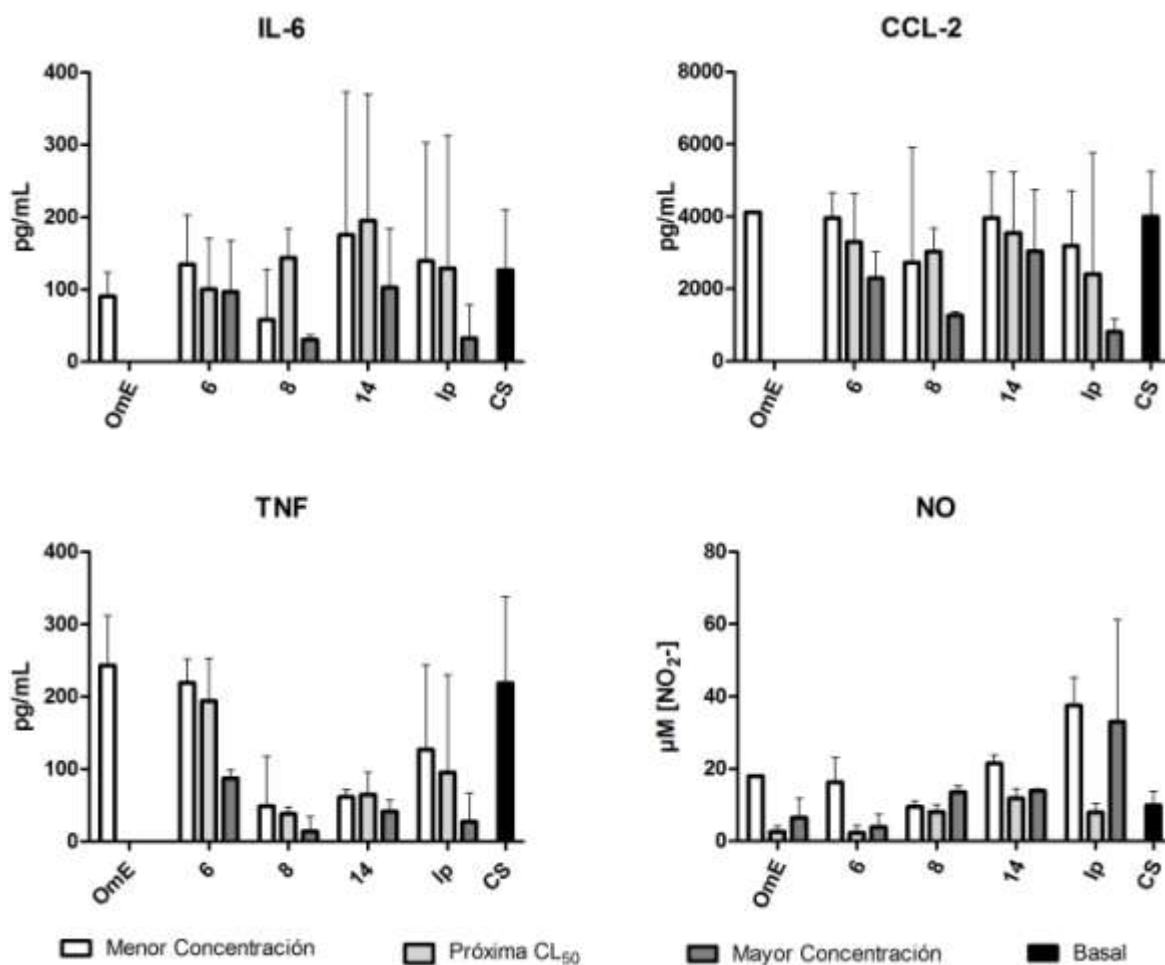


Figura 4-1. Producción de citoquinas y óxido nítrico por macrófagos J774 expuestos a extractos y compuestos de Lauraceae. Cuantificación de *chemokine lignd 2* (CCL-2), interleuquina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF) y óxido nítrico (NO). En el eje y,

se presentan las cantidades en unidades de picogramos por mililitro (pg/mL) y micromolar (μM). La concentración de NO reportado es una medida indirecta, en el gráfico se presenta la concentración de nitritos [NO_2^-] con respecto a una curva de nitrito de sodio (véase metodología, punto 4.1.2). En el eje x, se presentan los códigos de los extractos y/o compuestos con que fueron tratadas las células. Las barras blancas corresponden a la menor concentración, las barras grises claro a la concentración más próxima a la CL_{50} y, las barras de gris oscuro, identifican la mayor concentración. Las barras negras representan el basal, producto de las células no expuestas (CS) a ningún tratamiento; Ip, células expuestas a isetionato de pentamidina.

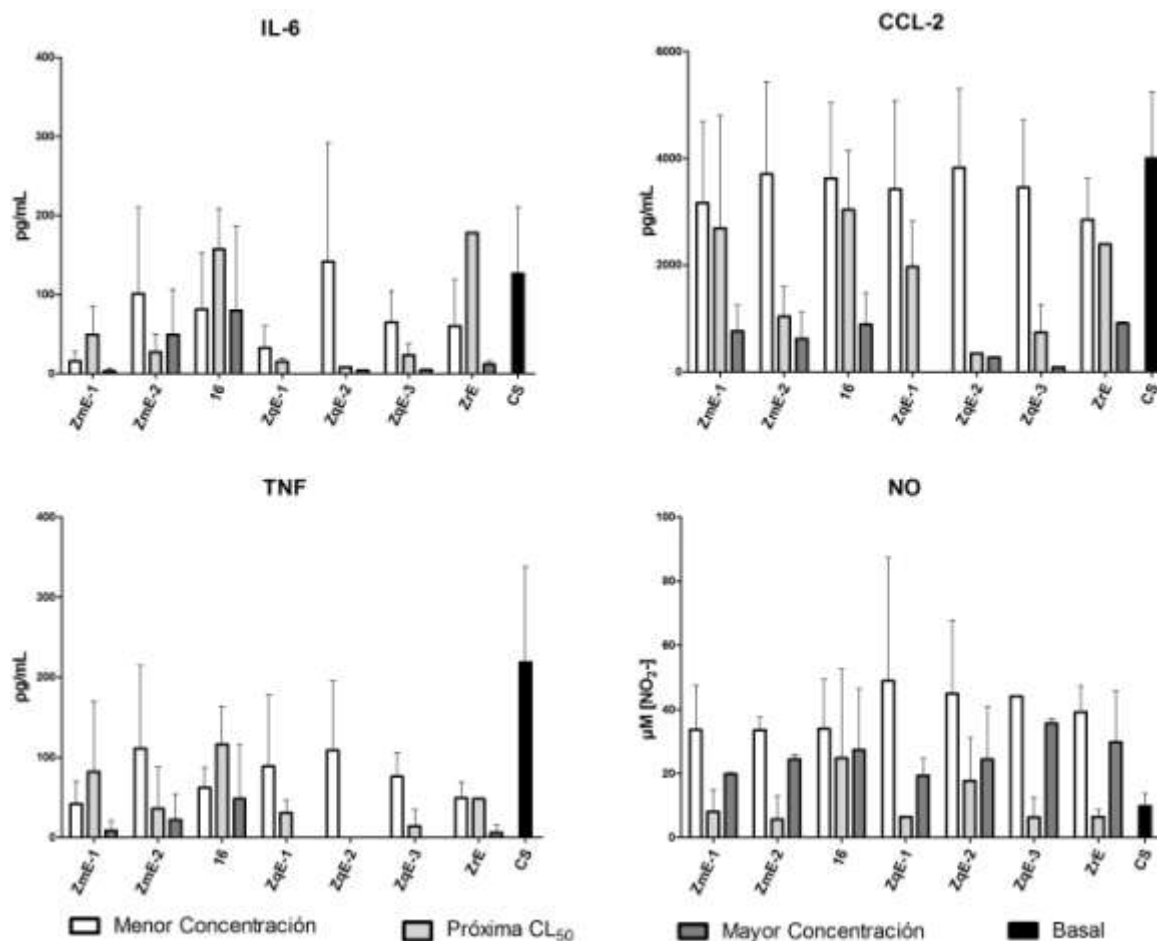


Figura 4-2. Producción de citoquinas y óxido nítrico por macrófagos J774 expuestos a extractos y compuestos de Rutaceae. Cuantificación de *chemokine ligand 2* (CCL-2), interleuquina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF) y óxido nítrico (NO). En el eje y, se presentan las cantidades en unidades de picogramos por mililitro (pg/mL) y micromolar (μM). La concentración de NO reportada es una medida indirecta, en el gráfico se presenta la concentración de nitritos [NO_2^-] con respecto a una curva de nitrito de sodio (véase metodología, punto 4.1.2). En el eje x, se presentan los códigos de los extractos y/o compuestos con que fueron tratadas las células. Las barras blancas corresponden a la menor concentración, las barras grises claro a la concentración más próxima a la CL_{50} y, las barras de gris oscuro, identifican la mayor concentración. Las barras negras representan el basal, producto de las células no expuestas (CS) a ningún tratamiento; Ip, células expuestas a isetionato de pentamidina.

representan el basal, producto de las células no expuestas (CS) a ningún tratamiento; Ip, células expuestas a isetionato de pentamidina.

Aunque para algunos extractos/compuestos, se observó una tendencia del efecto dependiente de la concentración, esta quizá se debió al efecto citotóxico que mostraron (i. e., 6 y 16). En cuanto a la producción de citoquinas, ningún extracto y/o compuesto mostró diferencias estadísticamente significativas. Por su parte, en lo relacionado con la producción de NO, algunos cambios significativos, con respecto al basal, se pudieron observar para la menor concentración (la cual no presenta algún efecto citotóxico) con los tratamiento de los extractos ZmE-2 ($p=0.027$), ZqE-3 ($p=0.0069$) y ZrE ($p=0.0451$). Incluso para la menor concentración de pentamidina, se encontró un cambio significativo con respecto al basal de producción de NO ($p=0.0473$). Estos resultados, teniendo en cuenta la selectividad que mostraron sobre promastigotes de *Leishmania spp.*, (entre 2 y 12 de IS, véase tabla 3-1), sugerían una gran posibilidad que estos extractos (ZmE-2, ZqE-3 y ZrE) eliminaran parásitos internalizados, a pesar de ello, cuando estos fueron evaluados sobre el modelo de MDMSP infectados, ninguno mostró efectos antileishmaniales. En el mismo sentido, el modelo de MDMSP, en cuanto a la producción de NO se refiere, no guardó efecto similar al visto con el uso de las J774 (véase tablas 4-2, 4-3 y Figura 4-3).

4.2.2 Inmunomodulación sobre MDMSP

Con el ánimo de conocer la potencial influencia de los tratamientos con los extractos y compuestos que mostraron algún grado de actividad leishmanicida, sobre la producción y liberación de citoquinas, sobrenadantes de MDMSP expuestos a estos tratamientos fueron ensayados con arreglos de CBA para la cuantificación de IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e IL-12. Para poder relacionar cambios en la producción de determinada citoquina al tratamiento, los sobrenadante seleccionados correspondían a tres diferentes concentraciones, las cuales, por provenir de ensayos de citotoxicidad, se seleccionaron teniendo en cuenta que dicha concentración no afectara la viabilidad de los MDMSP.

Sobre los macrófagos humanos se pudo observar que se mantuvo una producción basal de todas la citoquinas que fueron evaluadas, la cual presentó un alto grado de variabilidad (véase Tabla 4-2 y Figuras 4-3 y 4-4). Este comportamiento pudiese ser explicado, si se tiene en cuenta que las células utilizadas para cada ensayo provenían de diferentes donantes, lo cual posibilita que las diferencias genotípicas entre las células utilizadas se conviertan en una variable considerable. En este sentido, está documentado que polimorfismos en genes de citoquinas (como en cualquier otra proteína), pueden condicionar el nivel de producción de la misma. A pesar de esto, se pudieron observar producciones diferenciales de algunas citoquinas para determinados tratamientos, no obstante, carecían de significancia estadística.

Bajo las consideraciones anteriormente expuestas, el tratamiento con pentamidina se puede asociar con la reducción en la producción de IL-8, IL-6, IL-10 (véase Figura 4-3), sin embargo no fue posible detectar niveles de IL-1 β ni TNF en células expuestas a este tratamiento. Un comportamiento similar se pudo observar para la dihidroflavokavaina B (8), la cual se asoció con reducciones en los niveles de IL-8, IL-6 y la no detección de IL-

IL-1 β , IL-10 y TNF. También se puede observar un ligero incremento en la producción de IL-12 luego del tratamiento con esta dihidrochalcona.

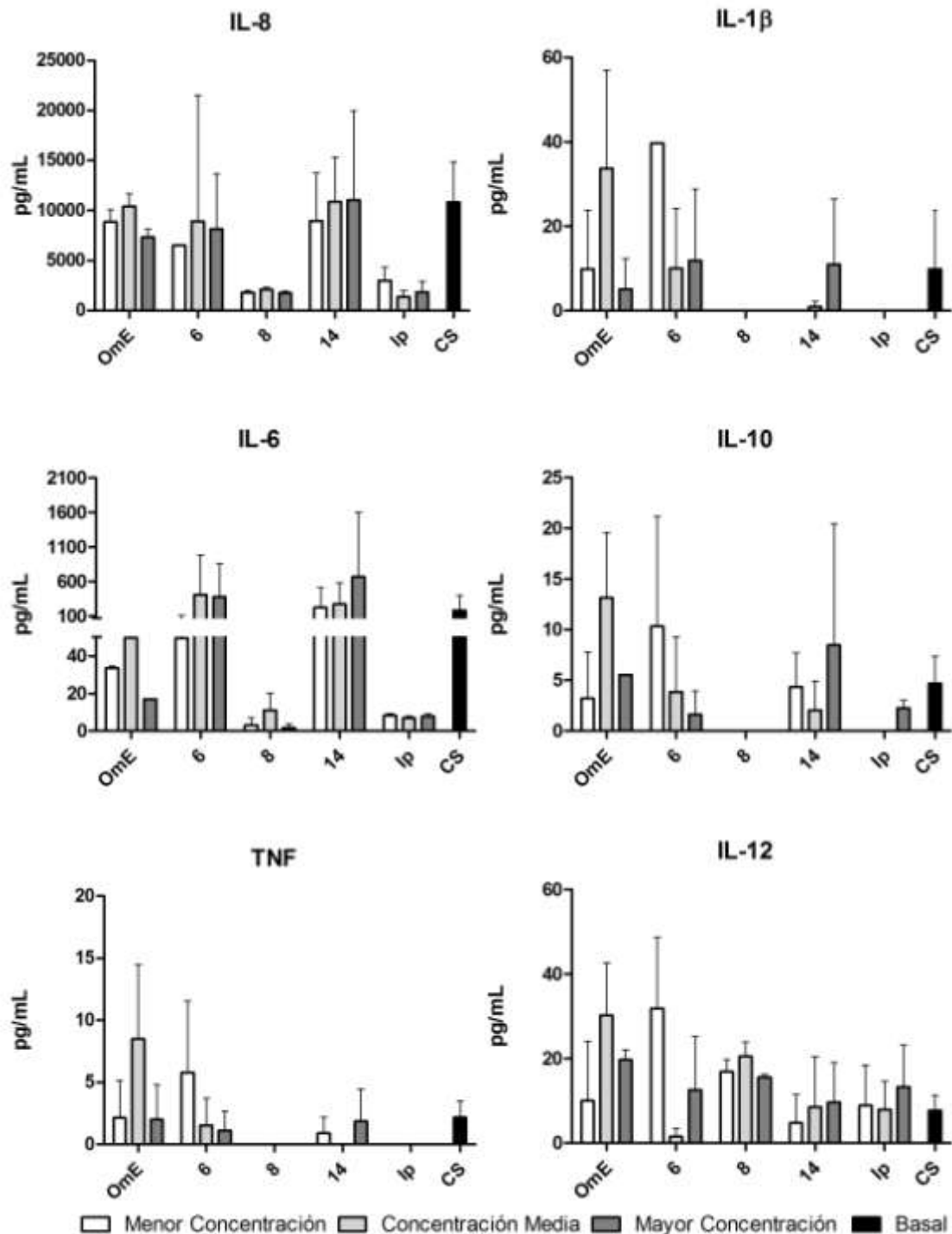


Figura 4-3. Producción de citoquinas por MDMSP expuestos a extractos y compuestos de Lauraceae. Cuantificación de interleuquina 8 (IL-8), interleuquina 1 β (IL-1 β), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 10 (IL-10), factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquina 12 (IL-12). En el eje y, se presentan las cantidades en unidades de

picogramos por mililitro (pg/mL). Las barras blancas corresponden a la menor concentración, las barras grises claro a la concentración más próxima a la CL_{50} y, las barras de gris oscuro, identifican la mayor concentración. Las barras negras representan el basal, producto de las células no expuestas (CS) a ningún tratamiento; Ip, células expuestas a isetionato de pentamidina.

Para los extractos y compuestos de Rutaceae el escenario no fue diferente, como se puede observar en la Figura 4-4, algunas respuestas diferenciales (sin significancia estadística) se pudieron apreciar. Tal es el caso de ZmE-1, el cual se logró relacionar con una ligera disminución de IL-8 e IL-10, y una reducción más notoria de IL-6. También fue posible observar un ligero aumento en los niveles de IL-12.

Al inicio de este capítulo se expuso acerca de la importancia de la producción de NO en la eliminación de parásitos de *Leishmania spp.*, por tal razón, se evaluó la producción de NO indirectamente a través de la cuantificación de nitritos mediante el sistema de reactivos de Griess, con el objetivo de determinar si el tratamiento y la posterior actividad leishmanicida de alguno de los extractos y/o compuestos aquí evaluados, se podía relacionar con el aumento en los niveles de NO.

Como control de la activación y estimulación de NO se utilizó LPS (un reconocido inductor de NO [105]). Una gráfica representativa de la producción de NO se presenta en la Figura 4-5, donde se puede observar que, dependiendo de la concentración ($r^2=0.9$), la exposición de los MDMSP al LPS aumenta los niveles de nitritos, un metabolito estable del NO, comúnmente usado como indicador de la producción de NO [103]. A la máxima concentración empleada, se logró evidenciar una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0063$) de la producción de NO con respecto al control negativo (células no expuestas a LPS). Adicionalmente, teniendo en cuenta que la IL-10 se ha asociado con la disminución en la producción de NO [106], se evaluó la producción de IL-10 por MDMSP expuestos a LPS y se encontró un $r^2=0.9494$ (véase Figura 4-6), lo que podría relacionarse con los bajos niveles de NO luego de la exposición con el LPS. No obstante se sugiere la evaluación con anticuerpos anti-IL-10, en aras de explicar si esta citoquina de forma autocrina, puede asociarse con dicho efecto. Es de resaltar que este efecto (concentración-dependiente por el LPS), pudo también ser observado para TNF e IL-12, resultados esperados en el contexto de la actividad pro-inflamatoria reportada para el LPS.

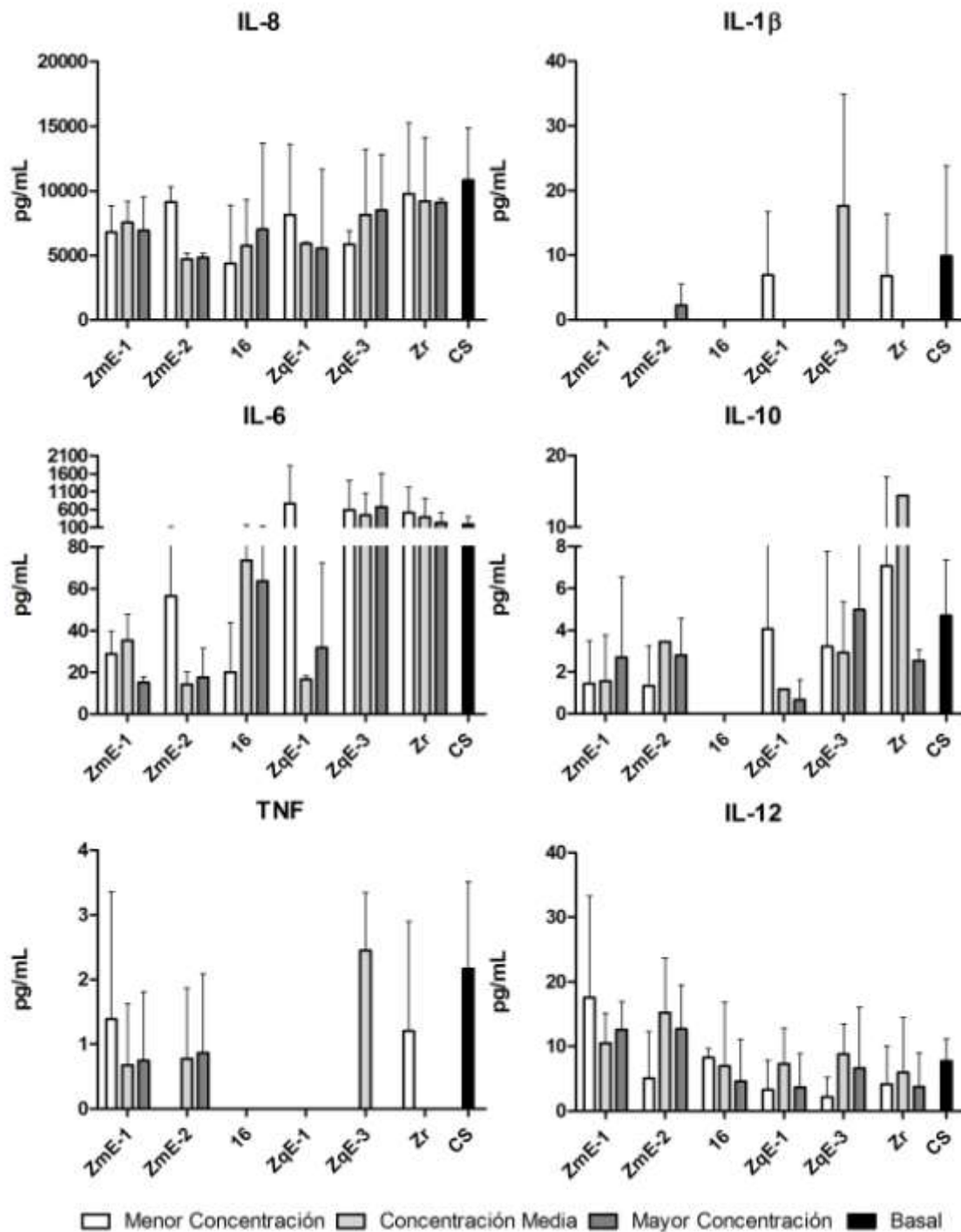


Figura 4-4. Producción de citoquinas por MDMSP expuestos a extractos y compuestos de Rutaceae. Cuantificación de interleuquina 8 (IL-8), interleuquina 1β (IL-1β), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 10 (IL-10), factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquina 12 (IL-12). En el eje y, se presentan las cantidades en unidades de picogramos por mililitro (pg/mL). Las barras blancas corresponden a la menor concentración, las barras grises claro a la concentración más próxima a la CL₅₀ y, las

barras de gris oscuro, identifican la mayor concentración. Las barras negras representan el basal, producto de las células no expuestas (CS) a ningún tratamiento.

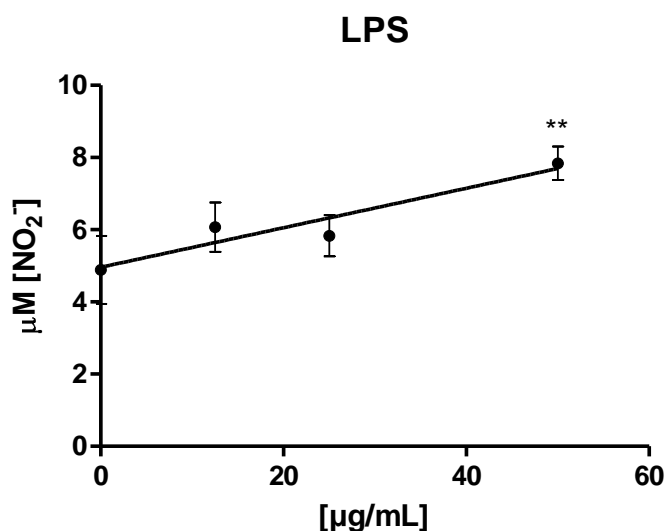


Figura 4-5. Producción de NO de MDMSP tratados con LPS. Los MDMSP fueron expuestos durante 72 h a diferentes concentraciones de LPS. La producción de NO fue medida indirectamente por la cuantificación de nitritos (NO₂⁻) a través de un ensayo de Griess. En el eje x están los valores de concentración de LPS que se utilizaron en los ensayo en µg/mL, en el eje y se presentan los datos de la concentración en µM de NO₂⁻. ** $p=0.0063$, con respecto al control (basal) de células no expuestas a LPS, $r^2=0.9$.

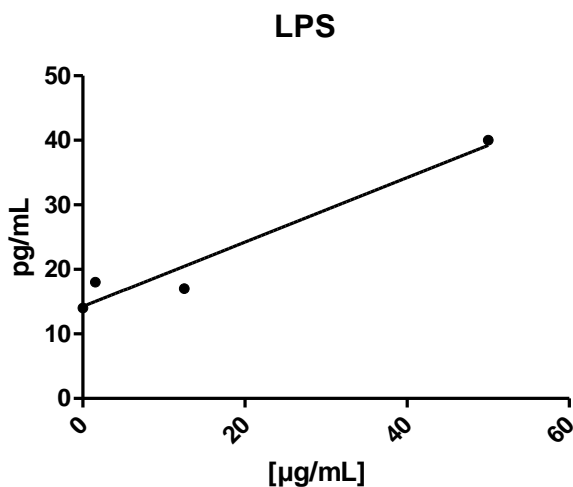


Figura 4-6. Producción de IL-10 por MDMSP expuestos a LPS. Los MDMSP fueron expuestos durante 72 h, a diferentes concentraciones de LPS. La liberación de interleuquina 10 (IL-10), fue medida por arreglos de CBA. En el eje x están los valores de concentración de LPS que se utilizaron en los ensayo en µg/mL, en el eje y se presentan los datos de la concentración en pg/mL de IL-10, $r^2=0.9494$.

De las sustancias evaluadas, sólo a ZmE-1 fue posible asociarla con un aumento significativo de NO ($p=0.0095$) con respecto al control (véase Figura 4-7), a la menor concentración aquí evaluada. Sin embargo, este comportamiento no fue consistente cuando se analizaron mayores concentraciones de este extracto.

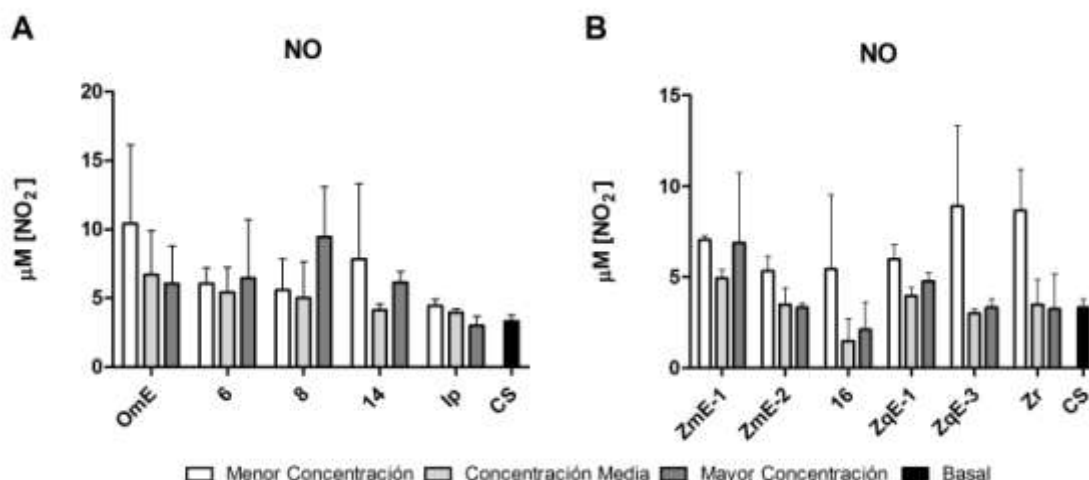


Figura 4-7. Producción de NO por parte de MDMSP tratados con extractos y compuestos de Lauraceae y Rutaceae. A) MDMSP expuestos a extractos y compuestos derivados de plantas Lauraceae. B) MDMSP expuestos a extractos y compuestos derivados de plantas Rutaceae. En eje x, los códigos de los tratamientos evaluados, en el eje y, la concentración en μM calculada. La concentración de NO reportada es una medida indirecta, en el gráfico se presenta la concentración de nitritos $[\text{NO}_2]$ con respecto a una curva de nitrito de sodio (véase metodología, punto 4.1.2). Las barras blancas corresponden a la menor concentración, las barras de gris claro a una concentración intermedia y, las barras de gris oscuro a la mayor concentración. Las barras negras representan el basal, producto de las células no expuestas (CS) a ningún tratamiento.

Con los resultados hasta aquí encontrados, no era posible postular algún efecto o actividad inmunomoduladora para ninguno de los extractos y/o compuestos evaluados. Sin embargo, quedaba evaluar el efecto que éstos tuvieran sobre células infectadas con el parásito. Por esta razón, y empleando las mismas herramientas experimentales, se planteó evaluar la liberación de citoquinas y producción de NO, pero sobre MDMSP expuestos a promastigotes de *L. panamensis*, utilizando los sobrenadantes de los ensayos de efectividad sobre formas internalizadas. Un resumen de los resultados obtenidos se presenta en la Tabla 4-3.

Para estos ensayos, los grupos control consistían en células no expuestas al parásito y sin ningún tipo de tratamiento (CS) y de células expuestas al parásito sin tratamiento alguno (Ci). Como se observa en la Figuras 4-8 o 4-9, comparando estos dos grupos se encontró, una diferencia significativa en cuanto a la producción de IL-8 ($p=0.0113$), fenómeno previamente reportado para *L. major* [107]. Aunque en el caso de IL-6 e IL-10 las diferencias encontradas no tuvieron significancia estadística, fue interesante encontrar que hubo un aumento de ambas, luego de que las células fueron expuestas al parásito. En el caso de IL-6, la producción fue de 88.54 y 26.9 pg/mL (para cada una de las réplicas), por lo menos el doble del promedio de las células no expuestas al parásito y en el caso de IL-

10 fue de 2.80 pg/mL (en las dos réplicas). Cuando se evaluó la producción de NO, también se logró ver un ligero aumento en el grupo de células infectadas, aunque no fue significativo (véase Tabla 4-3 y Figuras 4-10).

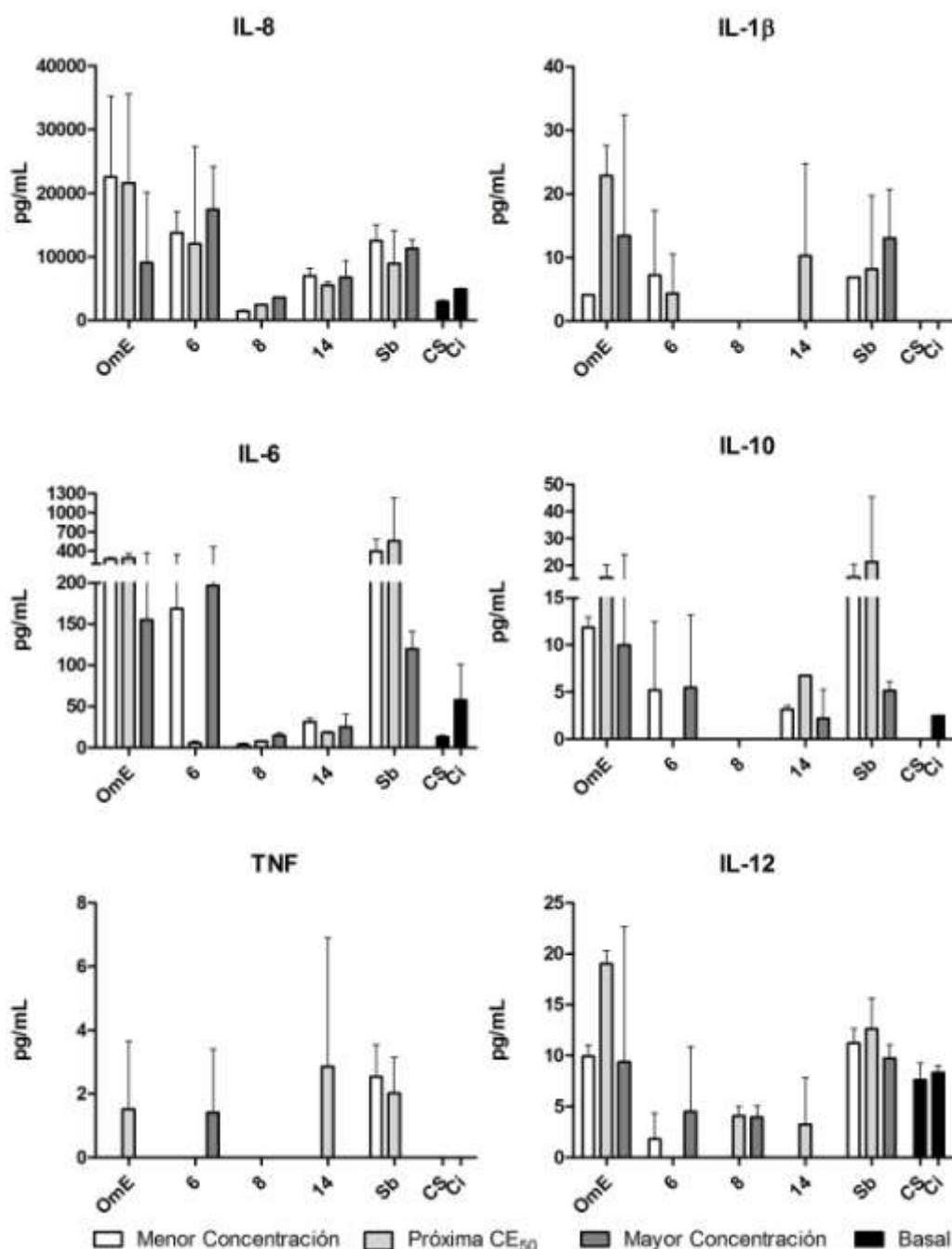


Figura 4-8. Producción de citoquinas por MDMSP infectados con *L. panamensis* expuestos a extractos y compuestos de Lauraceae. Cuantificación de interleuquina 8 (IL-8), interleuquina 1 β (IL-1 β), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 10 (IL-10), factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquina 12 (IL-12). En el eje y, se presentan las cantidades en unidades de picogramos por mililitro (pg/mL). En el eje x, se presentan los códigos de los extractos y/o compuestos con que fueron tratadas las células. Las barras blancas

corresponden a la menor concentración, las barras de gris claro a la concentración más próxima a la CE_{50} y las barras de gris oscuro, a la mayor concentración. Las barras negras representan el basal, que puede provenir de las células no expuestas (CS) o las células infectadas (Ci). Estibogluconato de sodio (Sb).

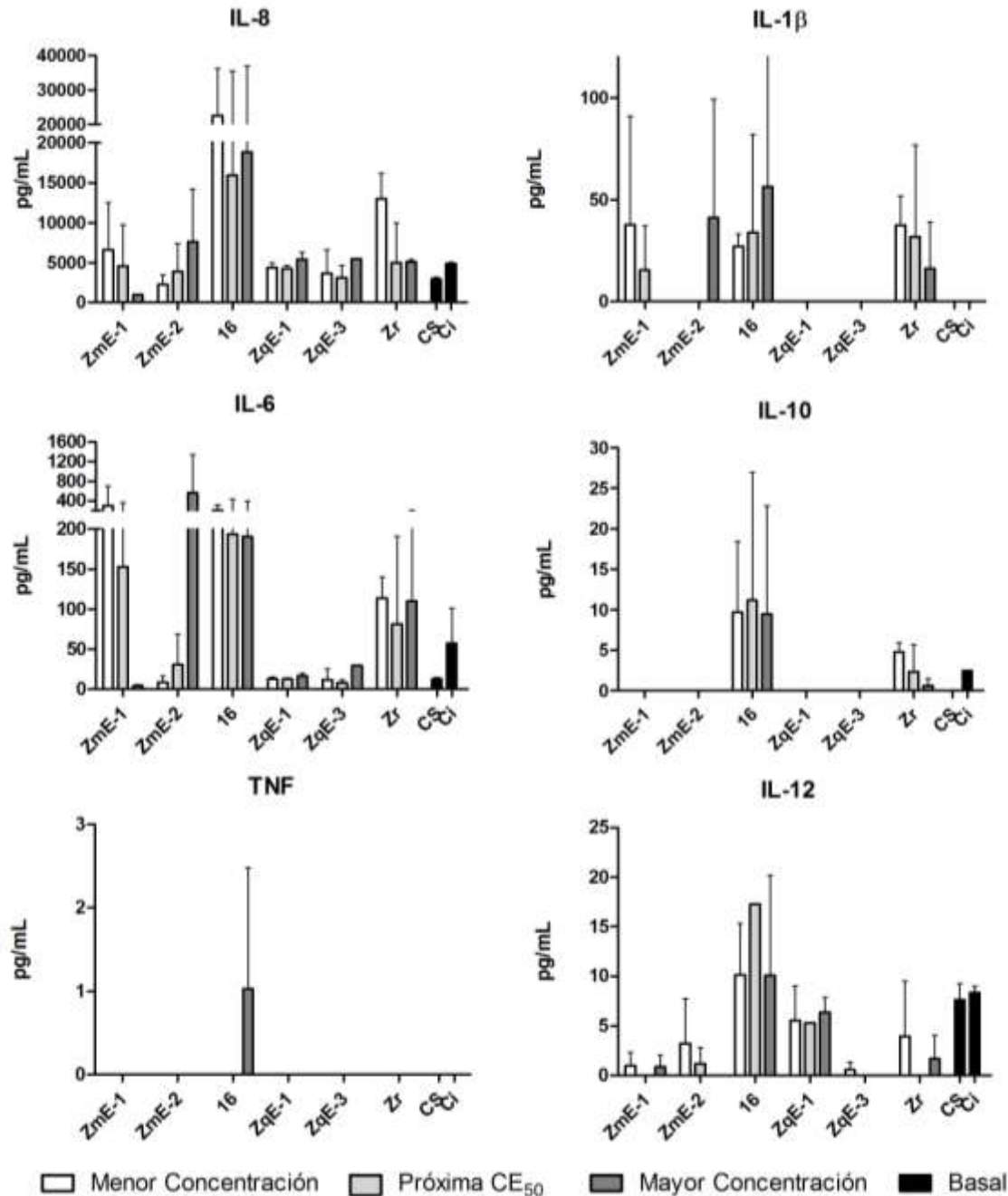


Figura 4-9. Producción de citoquinas por MDMSP infectados con *L. panamensis* expuestos a extractos y compuestos de Rutaceae. Cuantificación de interleuquina 8 (IL-8), interleuquina 1 β (IL-1 β), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 10 (IL-10), factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquina 12 (IL-12). En el eje y, se presentan las cantidades en unidades de picogramos por mililitro (pg/mL). En el eje x, se presentan los códigos de

los extractos y/o compuestos con que fueron tratadas las células. Las barras blancas corresponden a la menor concentración, las barras de gris claro a la concentración más próxima a la CE_{50} y las barras de gris oscuro, a la mayor concentración. Las barras negras representan el basal, que puede provenir de las células no expuestas (CS) o las células infectadas (Ci), cualquiera de las dos, en ausencia de tratamientos.

En los grupos experimentales se evidenció, que las células infectadas que fueron tratadas con estibogluconato de sodio (Sb, medicamento de primera línea contra leishmaniosis,) aumentaron significativamente la producción de IL-8 en la mayor y menor concentración ($p=0.0222$ y 0.0490 , respectivamente), como se puede apreciar en las Figuras 4-8 o 4-9. Un resultado similar (pero sin significancia estadística) se observó, para el grupo de células tratadas con OmE, como se puede ver en la Figura 4-8 (extracto que se mostró con un relevante poder leishmanicida sobre formas internalizadas, véase Tabla 3-4). Estos resultados son poco deseables si se tiene en cuenta que la IL-8 (también denominada CXCL8) tiene función quimiotáctica sobre polimorfonucleares neutrófilos, los cuales se han visto servir como “caballos de Troya” para *Leishmania spp.* [108]. Por otra parte, fue interesante encontrar que, para el grupo experimental tratado con ZmE-1 (extracto que también mostro relevancia antileishmanial sobre formas internalizadas, véase Tabla 3-7 y Figura 3-12), se pudo describir una tendencia (concentración-dependiente) significativa ($p=0.0008$) a la mayor concentración, respecto al grupo de células infectadas sin tratar, resultado que no se pudo observar para berberina (compuesto 16, derivado de ZmE-1) y que fue completamente opuesto al que mostró ZmE-1.

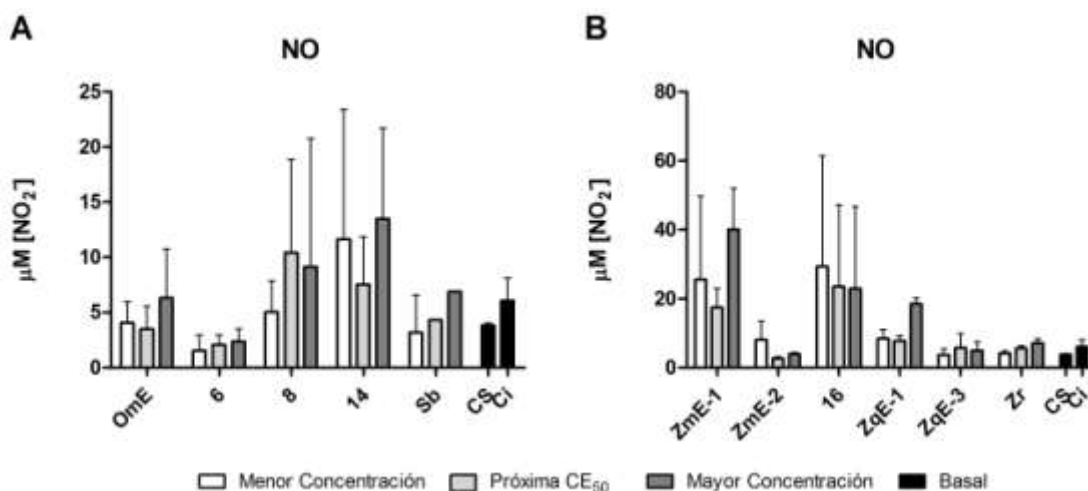


Figura 4-10. Producción de NO por parte de MDMSF infectados tratados con extractos y compuestos de Lauraceae y Rutaceae. A) MDMSF infectados expuestos a extractos y compuestos derivados de plantas Lauraceae. B) MDMSF infectados expuestos a extractos y compuestos derivados de plantas Rutaceae. En eje x, los códigos de los tratamientos evaluados, en el eje y, la concentración en μM calculada. La concentración de NO reportada es una medida indirecta, en el gráfico se presenta la concentración de nitritos [NO₂⁻] con respecto a una curva de nitrito de sodio (véase metodología, punto 4.1.2). Las barras blancas corresponden a la menor concentración, las barras de gris claro a la concentración más próxima a la CE_{50} y las barras de gris oscuro para la mayor concentración. Las barras negras representan el basal, que puede provenir de las células no

expuestas (CS) o las células infectadas (Ci), cualquiera de las dos, en ausencia de tratamientos.

Se ha propuesto que la IL-6 juega un papel, favoreciendo una respuesta Th2 y a la vez de inhibir una posible polarización hacia una respuesta comandada por linfocitos Th1 [50]. Acorde con el anterior postulado, nuevamente el Sb y OmE quedan en contraposición, ya que en ambos se encontraron aumentos significativos de IL-6 (véase Figura 4-8). Aunque para el Sb a las tres concentraciones evaluadas, la IL-6 se observó elevada, sólo a la menor concentración el incremento resulta significativo ($p=0.02$). Para OmE, también la IL-6 se mostró elevada, a las tres concentraciones, con diferencias significativas a la menor concentración ($p=0.0025$) y a la más próxima a la CE_{50} ($p=0.027$).

Estos resultados contrastan con los que se observaron en ZmE-1 (véase Figura 4-3), el cual se pudo asociar con una reducción (con tendencia concentración-dependiente) en los niveles de IL-6, con un ligero grado de significancia ($p=0.0367$) para la mayor concentración. Curiosamente a las otras dos concentraciones, se observó una mayor cantidad (no significativa) de IL-6. Por otro lado, como ocurrió con IL-8 los resultados vistos con la berberina, no guardaron relación alguna con ZmE-1.

En cuanto a la producción de IL-10 se pudo observar un aumento diferencial (pero sin significancia estadística), en los sobrenadantes de células tratadas con Sb. Un comportamiento similar se identificó en el grupo experimental tratado con OmE, el cual mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0.007$) sobre los resultados para la menor concentración aquí evaluada. Teniendo presente que a la IL-10 se le han atribuido efectos inhibitorios sobre IL-12 [97] e IFN- γ [98], y que incluso, experimentalmente ha mostrado también inhibir la producción NO [106], el panorama observado con Sb y OmE, en cuanto a la liberación de IL-10, no es alentador en el contexto de una respuesta inmune a una infección con *Leishmania spp.* Por otro lado, en el grupo de MDMSP tratados con ZmE-1 (posterior a la exposición al parásito), no se lograron identificar niveles detectables de IL-10 (véase tabla 4-3), comportamiento que no guardó la berberina, ya que en unos de los experimentos se pudieron detectar, niveles relativamente altos de IL-10. Un comportamiento similar a ZmE-1 se observó en los extractos ZmE-2, ZqE-1 y ZqE-3.

Hasta aquí, ZmE-1 se había podido asociar con un perfil de citoquinas, que en el marco de una infección con *Leishmania spp.*, serían favorables, a diferencia de Sb y OmE. No obstante, cuando se evaluó la liberación de IL-12 (citoquina de perfil Th1), el panorama cambió. Como se observa en la Tabla 4-3 y la Figura 4-9, el tratamiento con Sb se pudo relacionar con ligeros incrementos (aunque sin significancia estadística) en los niveles de IL-12, un resultado similar se observó en la concentración cercana a la CE_{50} (75 $\mu\text{g/mL}$) del grupo de células tratadas con OmE ($p=0.0168$). Es de resaltar, que dicho fenómeno no fue dependiente de la concentración. Por su parte, las células infectadas expuestas a ZmE-1, redujeron significativamente la liberación de IL-12 ($p=0.02$, 0.003 y 0.0159, respectivamente, en orden ascendente, para las concentraciones aquí evaluadas). Un resultado similar se observó para ZqE-3.

Como se expuso al principio de este capítulo, el NO es una molécula importante en la depuración de parásitos por parte de los macrófagos, por esa razón, se analizó si existían cambios diferenciales en la producción de NO que se pudieran relacionar con el tratamiento. Solo ZmE-1 se encontró asociado con producciones elevadas diferenciales de

NO, con respecto a las células infectadas sin tratamiento. Sin embargo, a ninguna concentración se encontró significancia estadística. A pesar de ello, fue interesante saber que estos resultados se relacionaron consecuentemente con los niveles de IL-10 (citoquina que ha mostrado inhibir la producción de NO [106]), que fueron medidos para ZmE-1 (véase tabla 4-3 y Figura 4-10). No obstante, para poder entender el verdadero impacto de este tratamiento sobre la producción de NO, es importante tener presente que aunque el ensayo por reactivos de Griess es un estándar ampliamente empleado para la cuantificación de este tipo de metabolitos, el NO reacciona y puede derivarse en nitritos y nitratos, estos últimos se escapan de la medición. Sin embargo, actualmente se cuenta con herramientas que podrían solucionar esta variable, como la utilización de una enzima nitrato reductasa (EC 1.7.1.2). Además de esto, sería muy útil emplear algún tipo de inhibidores selectivos, para poder asociar estos niveles de nitritos con la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (EC 1.14.13.39).

Los anteriores resultados permiten especular que para OmE, el efectos leishmanicida se ejerce a través de la acción directa sobre el parásito, tomando en cuenta que: (i) la CE_{50} fue muy similar tanto sobre las formas libres como internalizadas (98.03 ± 19.87 y 89.08 ± 7.61 , respectivamente) y, (ii) si bien la variabilidad en los resultados obtenidos en la cuantificación de citoquinas y NO no permiten concluir su papel inmunomodulador, las tendencias observadas, discutidas previamente, sugieren que este no sería el responsable de la actividad leishmanicida observada. Por otro lado, para ZmE-1 el panorama es bastante diferente, ya que la acción antileishmanial observada fue significativamente diferente ($p=0.0018$) sobre promastigotes y amastigotes internalizados, $CE_{50}= 2.58 \pm 0.16$ y 35.39 ± 1.99 , respectivamente. Adicionalmente se encontraron efectos diferenciales en la producción de algunas citoquinas y de NO, lo cual permite sugerir evaluaciones más finas que descarten o confirmen este comportamiento (pruebas moleculares, niveles de óxido nítrico sintasa, entre otros). En relación con la berberina, que previamente ha sido reportada como antileishmanial, no tuvo el mismo comportamiento de ZmE-1, en cuanto a producción de citoquinas y NO, y por el contenido de berberina en el extracto (0.077%) es muy factible que existan otras moléculas que contribuyan en el potencial antileishmanial aquí descrito.

Tabla 4-2. Cuantificación de citoquinas y óxido nítrico por MDMSP expuestos a extractos y compuestos de Lauraceae y Rutaceae.

	IL-8 ^a	IL-1 β ^a	IL-6 ^a	IL-10 ^a	TNF ^a	IL-12 ^a	NO ^b
Células Solas ^c	10827,75 \pm 4036,75 ^d	9,89 \pm 13,98	182,23 \pm 216,4	4,69 \pm 2,68	2,17 \pm 1,34	7,74 \pm 3,49	3,33 \pm 0,46
OmE + ^e	7326,25 \pm 792,53	5,10 \pm 7,21	16,97 \pm 0,18	5,55 \pm ND ^h	2,00 \pm 2,82	19,67 \pm 2,41	6,07 \pm 2,74
OmE ₅₀ ^f	10400,97 \pm 1255,60	33,72 \pm 23,24	49,76 \pm 5,06	13,15 \pm 6,43	8,50 \pm 5,96	30,21 \pm 12,49	6,72 \pm 3,19
OmE - ^g	8865,94 \pm 1202,94	9,89 \pm 13,98	33,56 \pm 1,07	3,22 \pm 4,55	2,14 \pm 3,03	9,97 \pm 14,09	10,42 \pm 5,70
6 +	8143,23 \pm 5506,01	11,95 \pm 16,89	377,83 \pm 481,76	1,64 \pm 2,32	1,12 \pm 1,58	12,55 \pm 12,63	6,47 \pm 4,22
6 ₅₀	8907,36 \pm 12596,90	10,04 \pm 14,20	406,25 \pm 574,52	3,86 \pm 5,45	1,54 \pm 2,18	1,45 \pm 2,05	5,43 \pm 1,82
6 -	6510,76 \pm 44,80	39,72 \pm ND	49,47 \pm 60,50	10,32 \pm 10,85	5,78 \pm 5,78	31,82 \pm 16,81	6,07 \pm 1,14
8 +	1755,01 \pm 164,21	0,00 \pm 0,00	3,18 \pm ND	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	15,60 \pm 0,57	9,46 \pm 3,65
8 ₅₀	2111,08 \pm 201,48	0,00 \pm 0,00	11,03 \pm 9,24	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	20,46 \pm 3,48	5,02 \pm 2,62
8 -	1777,62 \pm 281,77	0,00 \pm 0,00	2,98 \pm 4,21	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	16,88 \pm 2,91	5,59 \pm 2,28
14 +	11040,5 \pm 8945,61	10,99 \pm 15,54	667,88 \pm 934,46	8,47 \pm 11,98	1,86 \pm 2,62	9,64 \pm 9,4	6,15 \pm 0,8
14 ₅₀	10869,135 \pm 4478,64	0,95 \pm 1,34	273,5 \pm 308,4	2,03 \pm 2,87	0,00 \pm 0,00	8,46 \pm 11,96	4,14 \pm 0,46
14 -	8969,44 \pm 4779,64	0,00 \pm ND	224,12 \pm 291,36	4,35 \pm 3,37	0,91 \pm 1,29	4,74 \pm 6,7	7,85 \pm 5,47
ZmE-1 +	6921,64 \pm 2606,42	0,00 \pm 0,00	15,22 \pm 2,63	2,71 \pm 3,83	0,75 \pm 1,06	12,63 \pm 4,29	6,88 \pm 3,88
ZmE-1 ₅₀	7528,65 \pm 1641,81	0,00 \pm ND	35,24 \pm 12,52	1,56 \pm 2,2	0,68 \pm 0,95	10,51 \pm 4,59	4,94 \pm 0,46
ZmE-1 -	6778,62 \pm 2083,91	0,00 \pm ND	28,84 \pm 10,79	1,45 \pm 2,05	1,39 \pm 1,97	17,56 \pm 15,73	7,04 \pm 0,23
ZmE-3 +	4823,67 \pm 298,12	2,23 \pm 3,25	17,63 \pm 13,85	2,81 \pm 1,77	0,87 \pm 1,22	12,73 \pm 6,83	3,33 \pm 0,23
ZmE-3 ₅₀	4686,37 \pm 492,3	0,00 \pm ND	14,2 \pm 5,85	3,44 \pm ND	0,78 \pm 1,1	15,22 \pm 8,44	3,49 \pm 0,91
ZmE-3 -	9146,73 \pm 1164,15	0,00 \pm ND	56,59 \pm 56,21	1,35 \pm 1,9	0,00 \pm 0,00	5,1 \pm 7,21	5,35 \pm 0,8
16 +	7009,45 \pm 6678,35	0,00 \pm 0,00	63,65 \pm 77,65	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	4,63 \pm 6,54	2,12 \pm 1,48
16 ₅₀	5739,97 \pm 3552,79	0,00 \pm 0,00	73,46 \pm 91,53	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	6,95 \pm 9,82	1,48 \pm 1,25
16 -	4364,42 \pm 4534,03	0,00 \pm 0,00	20 \pm 23,91	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	8,26 \pm 1,41	5,43 \pm 4,1
ZqE-1 +	5549,35 \pm 6131,17	0,00 \pm 0,00	31,78 \pm 40,78	0,68 \pm 0,96	0,00 \pm 0,00	3,69 \pm 5,21	4,78 \pm 0,46
ZqE-1 ₅₀	5915,3 \pm 109,04	0,00 \pm 0,00	16,69 \pm 1,62	1,18 \pm ND	0,00 \pm 0,00	7,28 \pm 5,55	3,98 \pm 0,46
ZqE-1 -	8142,85 \pm 5434,11	6,96 \pm 9,84	764,41 \pm 1064,51	4,06 \pm 5,73	0,00 \pm 0,00	3,27 \pm 4,62	5,99 \pm 0,8
ZqE-3 +	8489,19 \pm 4304,28	NR ⁱ	674,2 \pm 943,4	4,98 \pm 4,43	0,00 \pm 0,00	6,67 \pm 9,43	3,33 \pm 0,46
ZqE-3 ₅₀	8162,26 \pm 5048,03	17,64 \pm 17,26	438,58 \pm 607,43	2,92 \pm 2,45	2,45 \pm 0,89	8,79 \pm 4,7	3,01 \pm 0,23
ZqE-3 -	5835,49 \pm 1070,35	0,00 \pm ND	590,78 \pm 818,15	3,22 \pm 4,55	0,00 \pm ND	2,17 \pm 3,07	8,89 \pm 4,45
ZrE +	9112,47 \pm 276,84	0,00 \pm 0,00	228,92 \pm 296,3	2,54 \pm 0,52	0,00 \pm ND	3,74 \pm 5,28	3,25 \pm 1,94

	IL-8 ^a	IL-1 β ^a	IL-6 ^a	IL-10 ^a	TNF ^a	IL-12 ^a	NO ^b
ZrE ₅₀	9178,8 \pm 4936,93	0,00 \pm 0,00	384,13 \pm 522,07	14,36 \pm ND	0,00 \pm 0,00	5,99 \pm 8,46	3,49 \pm 1,37
ZrE -	9756,25 \pm 5468,87	6,8 \pm 9,62	509,92 \pm 707,04	7,07 \pm 9,99	1,2 \pm 1,7	4,17 \pm 5,9	8,65 \pm 2,28
Ip +	1841,7 \pm 1113,62	NR	7,86 \pm 1,25	2,24 \pm 0,79	0,00 \pm 0,00	13,27 \pm 9,93	3,01 \pm 0,68
Ip ₅₀	1395,49 \pm 604,51	0,00 \pm 0,00	6,92 \pm 1,07	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	7,86 \pm 6,76	3,98 \pm 0,23
Ip -	3004,43 \pm 1320,69	0,00 \pm 0,00	8,22 \pm 1,18	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	8,9 \pm 9,56	4,46 \pm 0,46

^aDatos expresados en pg/mL. ^bDatos expresados en μ M. ^cCélulas no expuestas a ningún tratamiento, representa la producción basal.

^dDesviación estándar. ^eEl signo + representa la mayor concentración evaluada para cada extracto o compuesto. ^fEl número ₅₀ representa una concentración intermedia. ^gEl signo - representa la menor concentración que fue utilizada en el ensayo de citotoxicidad para un extracto o compuesto dado. ^hND: No disponible, una réplica con niveles indetectables de citoquina. ⁱNR: Dato no reportado por el equipo, niveles indetectables de la citoquina.

Tabla 4-3. Cuantificación de citoquinas y óxido nítrico por MDMSF infectados expuestos a extractos y compuestos de Lauraceae y Rutaceae.

	IL-8 ^a	IL-1 β ^a	IL-6 ^a	IL-10 ^a	TNF ^a	IL-12 ^a	NO ^b
Células Solas ^c	2919,19 \pm ^h 257,40	0,00 \pm 0,00	12,85 \pm 1,92	0,00 \pm ND	0,00 \pm 0,00	7,62 \pm 1,66	3,81 \pm 0,23
Cel Infectadas ^d	4883,97 \pm 150,92	0,00 \pm 0,00	57,72 \pm 43,59	2,48 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	8,35 \pm 0,63	6,07 \pm 2,05
OmE + ^e	9055,52 \pm 11057,21	13,41 \pm 18,96	155,39 \pm 213,59	10,00 \pm 14,14	0,00 \pm 0,00	9,39 \pm 13,28	6,31 \pm 4,45
OmE ₅₀ ^f	21539,53 \pm 14011,58	22,84 \pm 4,77	292,12 \pm 67,11	15,52 \pm 4,75	1,52 \pm \pm 2,14	19,01 \pm 1,31	3,49 \pm 2,05
OmE - ^g	22549,17 \pm 12705,25	4,12 \pm ND	278,92 \pm 18,58	11,84 \pm 1,12	0,00 \pm ND	9,93 \pm 1,08	4,06 \pm 1,94
6 +	17382,21 \pm 6816,83	0,00 \pm ND	196,86 \pm 269,16	5,48 \pm 7,74	1,41 \pm 1,99	4,51 \pm 6,38	2,36 \pm 1,14
6 ₅₀	12023,43 \pm 15270,75	4,39 \pm 6,20	5,71 \pm 2,52	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	2,04 \pm 0,91
6 -	13755,51 \pm 3351,24	7,22 \pm 10,20	168,94 \pm 175,26	5,19 \pm 7,34	0,00 \pm 0,00	1,81 \pm 2,56	1,56 \pm 1,37
8 +	3614,29 \pm 53,03	0,00 \pm 0,00	14,94 \pm 3,31	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	3,96 \pm 1,12	9,13 \pm 11,63
8 ₅₀	2468,39 \pm 2,73	0,00 \pm ND	7,67 \pm 0,56	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	4,07 \pm 0,97	10,42 \pm 8,44
8 -	1465,16 \pm 160,19	0,00 \pm 0,00	3,41 \pm 1,98	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm ND	5,02 \pm 2,85
14 +	6747,14 \pm 2618,83	0,00 \pm 0,00	25,16 \pm 15,22	2,19 \pm 3,09	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	13,49 \pm 8,21
14 ₅₀	5519,79 \pm 452,24	10,28 \pm 14,53	18,08 \pm 1,52	0,00 \pm ND	2,86 \pm 4,04	3,25 \pm 4,60	7,52 \pm 4,33
14 -	6955,98 \pm 1260,67	0,00 \pm 0,00	31,22 \pm 4,40	1,45 \pm 2,05	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm ND	11,63 \pm 11,74
ZmE-1 +	982,03 \pm 19,79	0,00 \pm 0,00	4,3 \pm 1,41	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,85 \pm 1,20	40,09 \pm 11,86
ZmE-1 ₅₀	4606,41 \pm 5105,86	15,43 \pm 21,82	152,87 \pm 210,17	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	17,44 \pm 5,59

	IL-8 ^a	IL-1 β ^a	IL-6 ^a	IL-10 ^a	TNF ^a	IL-12 ^a	NO ^b
ZmE-1 -	6613,72 \pm 5877,1	37,72 \pm 53,34	301,28 \pm 398,82	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,97 \pm 1,63	25,58 \pm 24,17
ZmE-3 +	7618,41 \pm 6541,7	41,21 \pm 58,27	562,49 \pm 774,31	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm ND	3,89 \pm 0,47
ZmE-3 ₅₀	3891,67 \pm 3501,67	0,00 \pm 0,00	30,92 \pm 37,80	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	1,17 \pm 1,65	2,60 \pm 0,57
ZmE-3 -	2249,64 \pm 1243,74	0,00 \pm 0,00	8,78 \pm 7,53	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	3,22 \pm 4,55	8,09 \pm 5,36
16 +	18816,62 \pm 18209,48	56,44 \pm 79,81	190,54 \pm 211,01	9,46 \pm 13,37	1,03 \pm 1,46	10,07 \pm 10,13	22,92 \pm 23,83
16 ₅₀	15941,66 \pm 19682,33	33,99 \pm 48,06	193,70 \pm 246,49	11,16 \pm 15,78	0,00 \pm 0,00	17,23 \pm ND	23,48 \pm 23,71
16 -	22456,29 \pm 13840,26	27,07 \pm 6,31	208,31 \pm 110,75	9,68 \pm 8,75	0,00 \pm 0,00	10,13 \pm 5,21	29,29 \pm 32,15
ZqE-1 +	5422,45 \pm 893,08	NR ^j	16,51 \pm 3,52	0,00 \pm ND	0,00 \pm ND	6,36 \pm 1,51	18,49 \pm 1,60
ZqE-1 ₅₀	1971,52 \pm 2788,15	0,00 \pm 0,00	12,63 \pm 1,53	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	5,29 \pm ND	7,76 \pm 1,48
ZqE-1 -	1975,58 \pm 2793,89	0,00 \pm 0,00	12,83 \pm 2,64	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	5,53 \pm 3,51	8,41 \pm 2,62
ZqE-3 +	5445,60 \pm ND ⁱ	0,00 \pm ND	29,58 \pm ND	0,00 \pm ND	0,00 \pm ND	0,00 \pm ND	4,94 \pm 2,51
ZqE-3 ₅₀	3075,44 \pm 1626,37	0,00 \pm 0,00	8,12 \pm 4,0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	5,68 \pm 4,22
ZqE-3 -	3648,68 \pm 2954,12	0,00 \pm 0,00	11,93 \pm 13,75	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,56 \pm 0,78	3,73 \pm 1,71
ZrE +	5096,36 \pm 295,17	16,26 \pm 22,99	109,91 \pm 95,23	0,64 \pm 0,91	0,00 \pm 0,00	1,68 \pm 2,37	7,12 \pm 1,25
ZrE ₅₀	5007,68 \pm 4955,93	31,82 \pm 45,00	81,09 \pm 109,73	2,36 \pm 3,34	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm ND	5,59 \pm 0,68
ZrE -	13014,14 \pm 3174,45	37,43 \pm 14,52	113,92 \pm 26,52	4,81 \pm 1,13	0,00 \pm 0,00	3,95 \pm 5,59	4,14 \pm 0,68
Sb +	11280,95 \pm 1362,09	13,06 \pm 7,72	120,07 \pm 21,69	5,14 \pm 0,95	0,00 \pm 0,00	9,74 \pm 1,34	6,88 \pm 0,0
Sb ₅₀	8956,99 \pm 5098,9	8,18 \pm 11,57	559,45 \pm 671,16	21,26 \pm 24,24	2,02 \pm 1,13	12,61 \pm 3,05	4,3 \pm ND
Sb -	12523,44 \pm 2480,5	6,91 \pm ND	395,6 \pm 183,59	15,67 \pm 4,67	2,54 \pm 1,01	11,22 \pm 1,44	3,17 \pm 3,42

^aDatos expresados en pg/mL. ^bDatos expresados en μ M. ^cCélulas no expuestas a ningún tratamiento, representa la producción basal.

^dCélulas infectadas sin ningún tipo de tratamiento. ^eEl signo + representa la mayor concentración evaluada para cada extracto o compuesto. ^fEl número ₅₀ representa la concentración más cercana a la CE₅₀ calculada para determinado extracto y/o compuesto. ^gEl signo - representa la menor concentración que fue utilizada en el ensayo de citotoxicidad para un extracto o compuesto dado. ^hDesviación estándar. ⁱND: No disponible, una réplica con niveles indetectables de citoquina. ^jNR: Dato no reportado por el equipo, niveles indetectables de la citoquina.

5 Conclusiones y Perspectivas

- I. De las 25 sustancias (entre extractos y compuestos) evaluadas en este trabajo, a 11 fue posible evidenciarles un efecto leishmanicida sobre promastigotes de *L. panamensis* y *L. braziliensis*. Adicionalmente, 4 compuestos (todos ellos derivados de Lauraceae) también exhibieron propiedades antileishmaniales, aunque solo sobre promastigotes de *L. panamensis*. Estos resultados sugieren, propiedades antileishmaniales para *O. macrophylla* (Lauraceae), *P. cinereum* (Lauraceae), *Z. monophyllum* (Rutaceae), *Z. quinduense* (Rutaceae) y *Z. rhoifolium* (Rutaceae).
- II. Se identificaron tendencias en relaciones de estructura-actividad, para neolignanos benzofuránicos. Se propone con base en estos hallazgos, que la sustitución del grupo arilo y la presencia de un grupo 3,4,5-trimetoxifenil como unidad C₆C₃, son factores estructurales que se quizá favorecen una mejor actividad leishmanicida. A su vez para los lignanos ariltetralínicos, la saturación del anillo tetralínico se evidenció como un factor relevante, en la actividad leishmanicida mostrada para este tipo de compuestos.
- III. Se encontró que, los extractos etanólicos de hojas de *O. macrophylla* y corteza de *Z. monophyllum*, poseen actividad leishmanicida sobre formas internalizadas, con IS de 3 y 4, respectivamente. Adicionalmente, el compuesto 16 (berberina), derivado del extracto etanólico de corteza de *Z. monophyllum*, también fue hábil reducción el porcentaje de células infectadas, con una CE₅₀ = 7,32 ± 7,28 y un IS de 4.
- IV. En cuanto a los posibles efectos inmunomoduladores, los resultados aquí obtenidos no permitieron atribuir dicho efecto a ningún extracto o compuesto. No obstante, algunas tendencias fueron discutidas en torno a ZmE-1, las cuales requieren ser evaluadas mediante otras técnicas, permitiendo evaluar si dicho efecto, se puede conservar a niveles moleculares (cambios en los niveles de expresión de los genes de estas citoquinas). Además de evaluar si tal efecto es directo o indirecto, esta misma evaluación debería hacerse sobre los niveles de expresión de la enzima óxido nítrico sintasa, encargada de la síntesis de NO.
- V. Metodológicamente, se puede validar el uso del SYBR® Safe y la microscopia con fluorescencia como una técnica rápida, sencilla, reproducible y segura para evidenciar y cuantificar infecciones *in vitro* con parásitos de *Leishmania spp.*
- VI. Finalmente también fue posible, con base en los resultados obtenidos para el extracto de PcE, que la búsqueda bioguiada de agentes activos es una estrategia experimental que puede, en determinadas circunstancias, limitar los hallazgos que se pueden alcanzar al momento de evaluar productos de origen natural. Por lo tanto, se sugiere continuar con los tamizajes minuciosos, exhaustivos y masivos, para llegar a conclusiones más acertadas y veraces, sobre las propiedades de un espécimen vegetal y sus respectivos extractos.

6 Referencias

1. Myler, P.J. y N. Fasel, *Leishmania : after the genome*. 2008, Wymondham: Caister Academic. xiv, 306 p., [1] p. of plates.
2. World Health Organization. *Leishmaniasis: the global trend*. Neglected tropical diseases 2009 30-01-2009 [citado 10-03-2010]; Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_leishmaniasis/en/index.html.
3. Pan American Health Organization, *Health in the Americas, 2007*. Scientific and technical publication (Washington, D.C.). 2007, Washington, D.C.: Pan American Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the World Health Organization. 2 v.
4. Saravia, N.G., K. Weigle, C. Navas, I. Segura, L. Valderrama, A.Z. Valencia, B. Escorcia, y D. McMahon-Pratt, *Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of Leishmania viannia in Colombia*. Am J Trop Med Hyg, 2002. 66(6): p. 738-44.
5. Rojas, R., L. Valderrama, M. Valderrama, M.X. Varona, M. Ouellette, y N.G. Saravia, *Resistance to antimony and treatment failure in human Leishmania (Viannia) infection*. J Infect Dis, 2006. 193(10): p. 1375-83.
6. Rodrigues, M.L., R.S. Costa, C.S. Souza, N.T. Foss, y A.M. Roselino, *Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1999. 41(1): p. 33-7.
7. Agrawal, V.K. y B.Z. Singh, *Miltefosine: First Oral Drug for Treatment of Visceral Leishmaniasis*. MJAFI, 2006. 62: p. 66-67.
8. Piscopo, T.V. y A.C. Mallia, *Leishmaniasis*. Postgrad Med J, 2006. 82(972): p. 649-57.
9. Soto, J. y P. Soto, *[Oral miltefosine to treat leishmaniasis]*. Biomedica, 2006. 26 Suppl 1: p. 207-17.
10. Perez-Victoria, F.J., M.P. Sanchez-Canete, K. Seifert, S.L. Croft, S. Sundar, S. Castanys, y F. Gamarro, *Mechanisms of experimental resistance of Leishmania to miltefosine: Implications for clinical use*. Drug Resist Updat, 2006. 9(1-2): p. 26-39.
11. Ribeiro-Gomes, F.L., A.C. Otero, N.A. Gomes, M.C. Moniz-De-Souza, L. Cysne-Finkelstein, A.C. Arnholdt, V.L. Calich, S.G. Coutinho, M.F. Lopes, y G.A. DosReis, *Macrophage interactions with neutrophils regulate Leishmania major infection*. J Immunol, 2004. 172(7): p. 4454-62.
12. Maurer-Cecchini, A., S. Decuyper, F. Chappuis, C. Alexandrenne, S. De Doncker, M. Boelaert, J.C. Dujardin, L. Loutan, J.M. Dayer, G. Tulliano, J. Arevalo, A. Llanos-Cuentas, y C. Chizzolini, *Immunological determinants of clinical outcome in Peruvian patients with tegumentary leishmaniasis treated with pentavalent antimonials*. Infect Immun, 2009. 77(5): p. 2022-9.
13. Rocha, L.G., J.R. Almeida, R.O. Macedo, y J.M. Barbosa-Filho, *A review of natural products with antileishmanial activity*. Phytomedicine, 2005. 12(6-7): p. 514-35.

14. Osorio, E., G.J. Arango, N. Jimenez, F. Alzate, G. Ruiz, D. Gutierrez, M.A. Paco, A. Gimenez, y S. Robledo, *Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae*. J Ethnopharmacol, 2007. 111(3): p. 630-5.
15. Bates, P.A., *Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies*. Int J Parasitol, 2007. 37(10): p. 1097-106.
16. Muskus, C.E. y M. Marin Villa, *[Metacyclogenesis: a basic process in the biology of Leishmania]*. Biomedica, 2002. 22(2): p. 167-77.
17. Olivier, M., D.J. Gregory, y G. Forget, *Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view*. Clin Microbiol Rev, 2005. 18(2): p. 293-305.
18. Barak, E., S. Amin-Spector, E. Gerliak, S. Goyard, N. Holland, y D. Zilberstein, *Differentiation of Leishmania donovani in host-free system: analysis of signal perception and response*. Mol Biochem Parasitol, 2005. 141(1): p. 99-108.
19. Velez, I.D., *¿Leishmaniosis o Leishmaniasis?* IATREIA, 1995. 8(3): p. 124-126.
20. Kassai, T., *The impact on database searching arising from inconsistency in the nomenclature of parasitic diseases*. Vet Parasitol, 2006. 138(3-4): p. 358-61.
21. World Health Organization. Executive Board. Session, *Control of leishmaniasis : report by the Secretariat*. 2006, Geneva: World Health Organization. 7 p.
22. Robledo, S.M., J.A. Puerta, D.L. Munoz, M. Guardo, y I.D. Velez, *[Efficacy and tolerance of pentamidine for treatment of cutaneous leishmaniasis caused by por L. (V) panamensis in Colombia]*. Biomedica, 2006. 26 Suppl 1: p. 188-93.
23. Instituto Nacional de Salud, *Sistema de Vigilancia en Salud Pública - SIVIGILA Semana Epidemiológica 51*. 2009, Bogotá. p 1-9.
24. King, R.J., D.H. Campbell-Lendrum, y C.R. Davies, *Predicting geographic variation in cutaneous leishmaniasis, Colombia*. Emerg Infect Dis, 2004. 10(4): p. 598-607.
25. Grevelink, S.A. y E.A. Lerner, *Leishmaniasis*. J Am Acad Dermatol, 1996. 34(2 Pt 1): p. 257-72.
26. el-Hassan, A.M. y E.E. Zijlstra, *Leishmaniasis in Sudan. Mucosal leishmaniasis*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2001. 95 Suppl 1: p. S19-26.
27. Zijlstra, E.E. y A.M. el-Hassan, *Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2001. 95 Suppl 1: p. S27-58.
28. Awasthi, A., R.K. Mathur, y B. Saha, *Immune response to Leishmania infection*. Indian J Med Res, 2004. 119(6): p. 238-58.
29. Sacks, D. y N. Noben-Trauth, *The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(11): p. 845-58.
30. Belkaid, Y., C.A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach, y D.L. Sacks, *CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity*. Nature, 2002. 420(6915): p. 502-7.
31. Mendez, S., S.K. Reckling, C.A. Piccirillo, D. Sacks, y Y. Belkaid, *Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity*. J Exp Med, 2004. 200(2): p. 201-10.
32. Mills, K.H., *Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?* Nat Rev Immunol, 2004. 4(11): p. 841-55.
33. Da Silva, R.P., B.F. Hall, K.A. Joiner, y D.L. Sacks, *CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective Leishmania major metacyclic promastigotes to human macrophages*. J Immunol, 1989. 143(2): p. 617-22.

34. van Zandbergen, G., M. Klinger, A. Mueller, S. Dannenberg, A. Gebert, W. Solbach, y T. Laskay, *Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages*. J Immunol, 2004. 173(11): p. 6521-5.
35. Aga, E., D.M. Katschinski, G. van Zandbergen, H. Laufs, B. Hansen, K. Muller, W. Solbach, y T. Laskay, *Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite Leishmania major*. J Immunol, 2002. 169(2): p. 898-905.
36. Iwu, M.M., J.E. Jackson, y B.G. Schuster, *Medicinal plants in the fight against leishmaniasis*. Parasitol Today, 1994. 10(2): p. 65-8.
37. Jaramillo, M.C., G.J. Arango, M.C. Gonzalez, S.M. Robledo, y I.D. Velez, *Cytotoxicity and antileishmanial activity of Annona muricata pericarp*. Fitoterapia, 2000. 71(2): p. 183-6.
38. Weniger, B., S. Robledo, G.J. Arango, E. Deharo, R. Aragon, V. Munoz, J. Callapa, A. Lobstein, y R. Anton, *Antiprotozoal activities of Colombian plants*. J Ethnopharmacol, 2001. 78(2-3): p. 193-200.
39. Monte, R.L., J.M. Barbosa, L.M. Sousa, P.F. Athayde, C.S. Dias, y M.R. Oliveira, *Crude ethanolic extract, lignoid fraction and yangambin from Ocotea duckei (Lauraceae) show antileishmanial activity*. Z Naturforsch C, 2007. 62(5-6): p. 348-52.
40. da Silva Filho, A.A., E.S. Costa, W.R. Cunha, M.L. e Silva, N.P. Nanayakkara, y J.K. Bastos, *In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from Nectandra megapotamica (Lauraceae)*. Phytother Res, 2008. 22(10): p. 1307-10.
41. Di Giorgio, C., F. Delmas, V. Akhmedjanova, E. Ollivier, I. Bessonova, E. Riad, y P. Timon-David, *In vitro antileishmanial activity of diphyllin isolated from Haplophyllum bucharicum*. Planta Med, 2005. 71(4): p. 366-9.
42. Di Giorgio, C., M. Lamidi, F. Delmas, G. Balansard, y E. Ollivier, *Antileishmanial activity of quinovic acid glycosides and cadambine acid isolated from Nauclea diderrichii*. Planta Med, 2006. 72(15): p. 1396-402.
43. Ahua, K.M., J.R. Ioset, K.N. Ioset, D. Diallo, J. Mauel, y K. Hostettmann, *Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine*. J Ethnopharmacol, 2007. 110(1): p. 99-104.
44. Ferreira, M.E., A. Rojas de Arias, S. Torres de Ortiz, A. Inchausti, H. Nakayama, C. Thouvenel, R. Hocquemiller, y A. Fournet, *Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of Zanthoxylum chiloperone var. angustifolium*. J Ethnopharmacol, 2002. 80(2-3): p. 199-202.
45. Calla-Magarinos, J., A. Gimenez, M. Troye-Blomberg, y C. Fernandez, *An alkaloid extract of evanta, traditionally used as anti-leishmania agent in Bolivia, inhibits cellular proliferation and interferon-gamma production in polyclonally activated cells*. Scand J Immunol, 2009. 69(3): p. 251-8.
46. Launois, P., I. Maillard, S. Pingel, K.G. Swihart, I. Xenarios, H. Acha-Orbea, H. Diggelmann, R.M. Locksley, H.R. MacDonald, y J.A. Louis, *IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to Leishmania major in BALB/c mice*. Immunity, 1997. 6(5): p. 541-9.
47. Kopf, M., F. Brombacher, G. Kohler, G. Kienzle, K.H. Widmann, K. Lefrang, C. Humborg, B. Ledermann, y W. Solbach, *IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with Leishmania major*. J Exp Med, 1996. 184(3): p. 1127-36.

48. Sadick, M.D., N. Street, T.R. Mosmann, y R.M. Locksley, *Cytokine regulation of murine leishmaniasis: interleukin 4 is not sufficient to mediate progressive disease in resistant C57BL/6 mice*. Infect Immun, 1991. 59(12): p. 4710-4.
49. Julia, V. y N. Glaichenhaus, *CD4(+) T cells which react to the Leishmania major LACK antigen rapidly secrete interleukin-4 and are detrimental to the host in resistant B10.D2 mice*. Infect Immun, 1999. 67(7): p. 3641-4.
50. Diehl, S. y M. Rincon, *The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation*. Mol Immunol, 2002. 39(9): p. 531-6.
51. McHugh, S.L., C.A. Newton, Y. Yamamoto, T.W. Klein, y H. Friedman, *Tumor necrosis factor induces resistance of macrophages to Legionella pneumophila infection*. Proc Soc Exp Biol Med, 2000. 224(3): p. 191-6.
52. Durr, M. y A. Peschel, *Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense*. Infect Immun, 2002. 70(12): p. 6515-7.
53. Brandonisio, O., M.A. Panaro, I. Fumarola, M. Sisto, D. Leogrande, A. Acquafredda, R. Spinelli, y V. Mitolo, *Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in Leishmania infantum-infected human macrophages*. Clin Exp Med, 2002. 2(3): p. 125-9.
54. Coy Barrera, E.D. y L.E. Cuca Suárez, *Chemical constituents from Pleurothyrium cinereum (van der Werff) (Lauraceae) from Colombia*. Biochem. Syst. Ecol., 2008. 36(8): p. 674-677.
55. Coy, E.D., L.E. Cuca, y M. Sefkow, *Macrophyllin-type bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from the leaves of Pleurothyrium cinereum*. J. Nat. Prod., 2009. 72(7): p. 1245-8.
56. Coy-Barrera, E.D., L.E. Cuca-Suarez, y M. Sefkow, *PAF-antagonistic bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from leaves of Ocotea macrophylla Kunth. (Lauraceae)*. Phytochemistry, 2009. 70(10): p. 1309-14.
57. Patiño, O.J. y L.E. Cuca, *Monophyllidin, a new alkaloid L-proline derivative from Zanthoxylum monophyllum*. Phytochemistry Letters. In Press, Corrected Proof.
58. Patiño Ladino, O.J. y L.E. Cuca Suárez, *Isoquinoline alkaloids of Zanthoxylum quinduense (Rutaceae)*. Biochemical Systematics and Ecology, 2010. 38(4): p. 853-856.
59. Patiño Ladino, O.J. y L.E. Cuca Suárez, *Chemical constituents of the wood from Zanthoxylum quinduense Tul. (Rutaceae)*. Química Nova, 2010. 33: p. 1019-1021.
60. Horobin, R.W. y K.J. Walter, *Understanding Romanowsky staining. I: The Romanowsky-Giemsa effect in blood smears*. Histochemistry, 1987. 86(3): p. 331-6.
61. Marshall, P.N., S.A. Bentley, y S.M. Lewis, *Staining properties and stability of a standardised Romanowsky stain*. J Clin Pathol, 1978. 31(3): p. 280-2.
62. Marshall, P.N., S.A. Bentley, y S.M. Lewis, *An evaluation of some commercial Romanowsky stains*. J Clin Pathol, 1975. 28(8): p. 680-5.
63. Gamboa Marín, Y.A. y L.G. Delgado Murcia, *Study of Leishmania Viannia infection by means of flow cytometry and Giemsa stain using human and murine macrophage lines (U-937 and J-774)*. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., 2008. 37(1): p. 84-95.

64. Sharif, M., H. Ziaei, M. Azadbakht, A. Daryani, A. Ebadattalab, y M. Rostami, *Effect of Methanolic Extracts of Artemisia aucheri and Camellia sinensis on Leishmania major (In Vitro)*. Turk J Med Sci, 2006. 36(6): p. 365-369.
65. Anoopkumar-Dukie, S., J.B. Carey, T. Conere, E. O'Sullivan, F.N. van Pelt, y A. Allshire, *Resazurin assay of radiation response in cultured cells*. Br J Radiol, 2005. 78(934): p. 945-7.
66. White, M.J., M.J. DiCaprio, y D.A. Greenberg, *Assessment of neuronal viability with Alamar blue in cortical and granule cell cultures*. J Neurosci Methods, 1996. 70(2): p. 195-200.
67. Vicik, R., V. Hoerr, M. Glaser, M. Schultheis, E. Hansell, J.H. McKerrow, U. Holzgrabe, C.R. Caffrey, A. Ponte-Sucré, H. Moll, A. Stich, y T. Schirmeister, *Aziridine-2,3-dicarboxylate inhibitors targeting the major cysteine protease of Trypanosoma brucei as lead trypanocidal agents*. Bioorg Med Chem Lett, 2006. 16(10): p. 2753-7.
68. Berman, J.D., *Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies*. Rev Infect Dis, 1988. 10(3): p. 560-86.
69. Basselin, M., F. Lawrence, y M. Robert-Gero, *Pentamidine uptake in Leishmania donovani and Leishmania amazonensis promastigotes and axenic amastigotes*. Biochem J, 1996. 315 (Pt 2): p. 631-4.
70. Kamanaka, M., P. Yu, T. Yasui, K. Yoshida, T. Kawabe, T. Horii, T. Kishimoto, y H. Kikutani, *Protective role of CD40 in Leishmania major infection at two distinct phases of cell-mediated immunity*. Immunity, 1996. 4(3): p. 275-81.
71. *Assay Guidance Manual Version 5.0*. 2008 [citado 06.12.2010]; Disponible en: http://www.ncgc.nih.gov/guidance/manual_toc.html.
72. Muñoz, D.I., D.P. Cardona, C. Alvaro, L.M. Carrillo, W. Quiñones, F. Echeverri, I.D. Vélez, y S.M. Robledo, *Effect of hydrazones against intracellular amastigotes of Leishmania panamensis and a parasitic cysteine protease*. Vitae, 2006. 13(2): p. 5-12.
73. Cherigo, L., V. Polanco, E. Ortega-Barria, M.V. Heller, T.L. Capson, y L.C. Rios, *Antitrypanosomal activity of a novel norlignan purified from Nectandra lineata*. Natural Product Research, 2005. 19(4): p. 373-7.
74. Brito, S., O. Crescente, A. Fernandez, A. Coronado, y N. Rodriguez, *Efficacy of a kaurenic acid extracted from the Venezuelan plant Wedelia trilobata (Asteracea) against Leishmania (Viannia) braziliensis*. Biomedica, 2006. 26 Suppl 1: p. 180-7.
75. Flores, E.N.V., Fernando; Gimenez T., Alberto; Jimenez D., Antonio., *Aislamiento y caracterización de los principios antifúngicos y leishmanicidas del Matico-Piper elongatum Vahl*. Biofarbo, 2001. 9(9): p. 45-50.
76. Suzuki, A., O. Shirota, K. Mori, S. Sekita, H. Fuchino, A. Takano, y M. Kuroyanagi, *Leishmanicidal active constituents from Nepalese medicinal plant Tulsi (Ocimum sanctum L.)*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2009. 57(3): p. 245-51.
77. Monte Neto, R.L., L.M. Sousa, C.S. Dias, J.M. Barbosa Filho, M.R. Oliveira, y R.C. Figueiredo, *Morphological and physiological changes in Leishmania promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from Ocotea duckei*. Exp Parasitol, 2011. 127(1): p. 215-21.
78. Van Miert, S., S. Van Dyck, T.J. Schmidt, R. Brun, A. Vlietinck, G. Lemiere, y L. Pieters, *Antileishmanial activity, cytotoxicity and QSAR analysis of synthetic dihydrobenzofuran lignans and related benzofurans*. Bioorg Med Chem, 2005. 13(3): p. 661-9.

79. Zschocke, S., S.E. Drewes, K. Paulus, R. Bauer, y J. van Staden, *Analytical and pharmacological investigation of Ocotea bullata (black stinkwood) bark and leaves*. J Ethnopharmacol, 2000. 71(1-2): p. 219-30.
80. Zschocke, S. y J. van Staden, *Cryptocarya species--substitute plants for Ocotea bullata? A pharmacological investigation in terms of cyclooxygenase-1 and -2 inhibition*. J Ethnopharmacol, 2000. 71(3): p. 473-8.
81. Arévalo, Y., S. Robledo, D.L. Muñoz, D. Granados-Falla, L.E. Cuca, y G. Delgado, *Evaluación in vitro de la actividad de aceites esenciales de plantas colombianas sobre Leishmania braziliensis*. Rev Colomb Ciencias Quim Farm, 2009. 38(2): p. 131-141.
82. Gebre-Hiwot, A., G. Tadesse, S.L. Croft, y D. Frommel, *An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1*. Acta Trop, 1992. 51(3-4): p. 237-45.
83. Roberts, W.L. y P.M. Rainey, *Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. 37(9): p. 1842-6.
84. Leifso, K., G. Cohen-Freue, N. Dogra, A. Murray, y W.R. McMaster, *Genomic and proteomic expression analysis of Leishmania promastigote and amastigote life stages: the Leishmania genome is constitutively expressed*. Mol Biochem Parasitol, 2007. 152(1): p. 35-46.
85. Hart, D.T. y G.H. Coombs, *Leishmania mexicana: energy metabolism of amastigotes and promastigotes*. Exp Parasitol, 1982. 54(3): p. 397-409.
86. Coombs, G.H., J.A. Craft, y D.T. Hart, *A comparative study of Leishmania mexicana amastigotes and promastigotes. Enzyme activities and subcellular locations*. Mol Biochem Parasitol, 1982. 5(3): p. 199-211.
87. Vennerstrom, J.L., J.K. Lovelace, V.B. Waits, W.L. Hanson, y D.L. Klayman, *Berberine derivatives as antileishmanial drugs*. Antimicrob Agents Chemother, 1990. 34(5): p. 918-21.
88. Nandi, R., D. Debnath, y M. Maiti, *Interactions of berberine with poly(A) and tRNA*. Biochim Biophys Acta, 1990. 1049(3): p. 339-42.
89. Ghosh, A.K., F.K. Bhattacharyya, y D.K. Ghosh, *Leishmania donovani: amastigote inhibition and mode of action of berberine*. Exp Parasitol, 1985. 60(3): p. 404-13.
90. Islam, A., A. Sayeed, M.S. Bhuiyan, M.A. Mosaddik, M.A. Islam, y G.R. Astaq Mondal Khan, *Antimicrobial activity and cytotoxicity of Zanthoxylum budrunga*. Fitoterapia, 2001. 72(4): p. 428-30.
91. Nissanka, A.P., V. Karunaratne, B.M. Bandara, V. Kumar, T. Nakanishi, M. Nishi, A. Inada, L.M. Tillekeratne, D.S. Wijesundara, y A.A. Gunatilaka, *Antimicrobial alkaloids from Zanthoxylum tetraspermum and caudatum*. Phytochemistry, 2001. 56(8): p. 857-61.
92. Mafezoli, J., P.C. Vieira, J.B. Fernandes, M.F. da Silva, y S. de Albuquerque, *In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of Trypanosoma cruzi*. J Ethnopharmacol, 2000. 73(1-2): p. 335-40.
93. Rodriguez-Guzman, R., M.M. Radwan, C.L. Burandt, J.S. Williamson, y S.A. Ross, *Xenobiotic biotransformation of 4-methoxy-N-methyl-2-quinolone, isolated from Zanthoxylum monophyllum*. Nat Prod Commun. 5(9): p. 1463-4.
94. de, A.G.W., A.D. Weber, S.R. Giacomelli, Dalcol, II, S.C. Hoelzel, y A.F. Morel, *Antibacterial alkaloids from Zanthoxylum rhoifolium*. Planta Med, 2003. 69(4): p. 371-4.

95. da Silva, S.L., P.M.S. Figueredo, y T. Yano, *Antibacterial and Antifungal Activities of Volatile Oils from Zanthoxylum Rhoifolium. Leaves*. Pharmaceutical Biology, 2006. 44(9): p. 657-659.
96. Jullian, V., G. Bourdy, S. Georges, S. Maurel, y M. Sauvain, *Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, Zanthoxylum rhoifolium Lam.* J Ethnopharmacol, 2006. 106(3): p. 348-52.
97. Aste-Amezaga, M., X. Ma, A. Sartori, y G. Trinchieri, *Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10.* J Immunol, 1998. 160(12): p. 5936-44.
98. D'Andrea, A., M. Aste-Amezaga, N.M. Valiante, X. Ma, M. Kubin, y G. Trinchieri, *Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells.* J Exp Med, 1993. 178(3): p. 1041-8.
99. Sundar, S., F. Rosenkaimer, M.L. Lesser, y H.W. Murray, *Immunochemotherapy for a systemic intracellular infection: accelerated response using interferon-gamma in visceral leishmaniasis.* J Infect Dis, 1995. 171(4): p. 992-6.
100. Arevalo, I., B. Ward, R. Miller, T.C. Meng, E. Najar, E. Alvarez, G. Matlashewski, y A. Llanos-Cuentas, *Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator.* Clin Infect Dis, 2001. 33(11): p. 1847-51.
101. Marcinkiewicz, J., *Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates.* Immunopharmacology, 1997. 37(1): p. 35-41.
102. Murray, H.W. y C.F. Nathan, *Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral Leishmania donovani.* J Exp Med, 1999. 189(4): p. 741-6.
103. Sun, J., X. Zhang, M. Broderick, y H. Fein, *Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay.* Sensors, 2003. 3(8): p. 276-284.
104. Jimenez, R., R. Ramirez, J. Carracedo, M. Agüera, D. Navarro, R. Santamaria, R. Perez, D. Del Castillo, y P. Aljama, *Cytometric bead array (CBA) for the measurement of cytokines in urine and plasma of patients undergoing renal rejection.* Cytokine, 2005. 32(1): p. 45-50.
105. Lowenstein, C.J., E.W. Alley, P. Raval, A.M. Snowman, S.H. Snyder, S.W. Russell, y W.J. Murphy, *Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(20): p. 9730-4.
106. Gazzinelli, R.T., I.P. Oswald, S.L. James, y A. Sher, *IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages.* J Immunol, 1992. 148(6): p. 1792-6.
107. Badolato, R., D.L. Sacks, D. Savoia, y T. Musso, *Leishmania major: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF.* Exp Parasitol, 1996. 82(1): p. 21-6.
108. Oghumu, S., C.M. Lezama-Davila, A.P. Isaac-Marquez, y A.R. Satoskar, *Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis.* Exp Parasitol, 2010. 126(3): p. 389-96.

Anexo A: Artículo publicado en *Natural Product Communications*

NPC
Natural Product Communications

 2011
Vol. 6
No. 2
231 - 234

Leishmanicidal and Cytotoxic Activities of Extracts and Naturally-Occurring Compounds from two Lauraceae Species

 Jeysson Sánchez-Suárez^a, Ericsson Coy-Barrera^b, Luis Enrique Cuca^b and Gabriela Delgado^{a*}
^aGrupo de Investigación en Inmunotoxicología, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, 57+1+3165120 Bogotá, Colombia

^bGrupo de Investigación en Productos Naturales Vegetales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

lgdelgadam@unal.edu.co

 Received: January 11th, 2011; Accepted: January 21st, 2011

The *in vitro* leishmanicidal effects of ethanolic extracts and fifteen naturally-occurring compounds (five lignans, eight neolignans, a diterpene and a dihydrochalcone), obtained from *Pleurothyrium cinereum* and *Ocotea macrophylla*, were evaluated on promastigotes of *Leishmania panamensis* and *L. braziliensis*. In addition, in order to determine the selective action on *Leishmania* species as a safety principle, *in vitro* cytotoxicity on J774 cells was also evaluated for test compounds and extracts. One extract and seven compounds showed activity against *Leishmania* parasites at different levels. Dihydroflavokawin B (**8**) was found to be the most potent antileishmanial compound on both parasites, whilst (+)-otobaphenol (**14**), was found to be the most selective compound on *L. panamensis*.

Keywords: *Leishmania panamensis*, *Leishmania braziliensis*, *Ocotea*, *Pleurothyrium*, *in vitro* evaluation.

Anexo B: Artículo aceptado para publicación en *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*



RCCQF-053

Bogotá D.C., septiembre 17 de 2010

Profesora
LUCY GABRIELA DELGADO MURCIA
Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia

Apreciada profesora,

Me permito comunicarle que el manuscrito científico remitido por usted a la Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, titulado: **Evaluación de la actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y fracciones de *Piper cumanense* y *Piper holtonii***, ha sido aceptado y por lo tanto será publicado en el Volumen 39 (1) del 2010, el cual se encuentra actualmente en proceso de edición.

Me despido cordialmente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Fleming Martínez R.", is written over a horizontal line.

FLEMING MARTÍNEZ R.
Editor
Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.

Anexo C: Artículo aceptado para publicación en *Experimental Parasitology*

Date: May 23, 2011
To: "Gabriela Delgado" lgdelgadam@unal.edu.co
From: "EP (ELS)" ep@elsevier.com
Subject: EP-10-314R3: Final Decision

Ms. No.: EP-10-314R3

Title: Use of a fluorescent stain for evaluating in vitro infection with *Leishmania panamensis*

Corresponding Author: Dr Gabriela Delgado

Authors: José-Julián Pérez-Cordero, MD, Biochemistry Magister Candidate; Jeysson Sánchez-Suárez, BSc, Biochemistry Magister Candidate;

Dear Dr. Delgado,

I am pleased to inform you that your manuscript referenced above has been accepted for publication. Your article has been forwarded to Elsevier's Production Department, and you should be receiving confirmation from them shortly.

Many thanks for submitting your fine paper to *Experimental Parasitology*.

Sincerely,

John Horton
Editor-in-Chief
Experimental Parasitology

Anexo D: Presentación oral en el XXIX Congreso Latinoamericano de Química



XXIX Congreso Latinoamericano de Química

CLAQ 2010

Bogotá, D.C, Mayo 13 de 2010

CARTA DE ACEPTACIÓN

CLAQ 075 -10

Estimado
Jeysson Sánchez Suárez
Universidad Nacional de Colombia
Colombia

Su trabajo: **"ACTIVIDAD LEISHMANICIDA IN VITRO DE EXTRACTOS Y COMPUESTOS DE PLANTAS COLOMBIANAS DE LAS FAMILIAS LAURACEAE Y RUTACEAE."**, del área temática "Productos Naturales" fue **ACEPTADO** para participar en el XXIX Congreso Latinoamericano de Química – CLAQ 2010. El cual se llevará a cabo en el Centro de Convenciones Julio Cesar Turbay Ayala, en Cartagena de Indias, Colombia, del 27 de septiembre al 01 de octubre de 2010.

La modalidad de presentación, el día y hora, será definida antes del 15 de junio próximo.

Le recordamos que su inscripción al CLAQ2010 debe ser realizada antes del 16 de junio de 2010 para proceder a ingresar su trabajo al libro de resúmenes.

Cordial Saludo

Comité Organizador

XXIX CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUIMICA – CLAQ2010

- XVI CONGRESO COLOMBIANO DE QUÍMICA
- 6º CONGRESO COLOMBIANO DE CROMATOGRFÍA
- Simposio: BIODIVERSIDAD Y ECOSISTEMAS: EL ROL DE LAS CIENCIAS QUÍMICAS
- FORO EDUCACIÓN



FABIAN PARADA ALFONSO
Presidente
Comité Organizador – CLAQ 2010



MIGUEL TOBAR CARRIZOSA
Presidente
Comité Científico – CLAQ 2010